

Université de Montréal

Département de sciences biologiques, Faculté des Arts et des Sciences

Ce mémoire intitulé

Étude de la thermo-sensibilité mitochondriale des espèces de moules d'eau douce
indigènes et invasives

Présenté par

Georges Hraoui

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Angers, Annie
Présidente-rapporteur

Breton, Sophie
Directrice de recherche

Boisclair, Daniel
Codirecteur

Pichaud, Nicolas
Membre du jury

Août 2019

© Georges Hraoui, 2019

Résumé

Les changements climatiques ont un impact sur quasiment toutes formes de vie. Des augmentations des moyennes de température ainsi que des fluctuations peuvent causer un stress, particulièrement chez les ectothermes aquatiques sessiles tels que les moules d'eau douce. Cependant, certaines espèces semblent mieux faire face à ces températures stressantes que d'autres. La tolérance au stress thermique peut par exemple expliquer le succès de certaines espèces envahissantes. Il est connu que les mitochondries peuvent jouer un rôle clé dans l'établissement de la thermo-tolérance des ectothermes. Dans cette étude, nous avons visé à caractériser la thermo-tolérance mitochondriale chez des moules d'eau douce endémiques et invasives. À travers l'utilisation de la respirométrie à haute résolution, nous avons analysé la respiration mitochondriale de deux espèces de moules d'eau douce exposées à plusieurs températures différentes. Nous avons remarqué que la moule invasive *Dreissena bugensis* possédait un métabolisme mitochondrial moins thermo-tolérant que la moule endémique *Elliptio complanata*. Cette lacune au niveau de la tolérance a été liée à une dépression métabolique aérobie plus marquée à des températures élevées. Ces résultats pourraient potentiellement être associées avec les traits de caractéristiques de vie de ces espèces, car *D. bugensis* est plus adaptée à des environnements instables dans lesquels les pressions de sélection pour des adaptations de résistance sont réduites. Nos résultats s'ajoutent à la littérature grandissante qui caractérise le métabolisme mitochondrial de plusieurs espèces aquatiques face aux changements climatiques.

Mots-clés : Mitochondries, Changements Climatiques, Thermo-sensibilité, Espèces Invasives,
Ectothermes Aquatiques

Abstract

Climate change is impacting many, if not all, forms of life. Increases in extreme temperature fluctuations and average temperatures can cause stress, particularly in aquatic sessile ectotherms such as freshwater mussels. However, some species seem to thrive more than others in face of temperature-related stressors. Thermal tolerance may for example explain invasive species success. It is also known that mitochondria can play a key role in setting an ectothermic species' thermal tolerance. In this study, we aimed to characterize the mitochondrial thermo-tolerance in invasive and endemic freshwater mussels. With the use of high-resolution respirometry, we analyzed the mitochondrial respiration of two freshwater bivalve species exposed to a broad range of temperatures. We noticed that the invasive dreissenid *Dreissena bugensis* displayed a less thermo-tolerant mitochondrial metabolism than the endemic unionid *Elliptio complanata*. This lack of tolerance was linked with a more noticeable depression of aerobic metabolism at elevated temperatures. These findings may be associated with the life history traits of both species, as *D. bugensis* is more adapted to unstable habitats, where selection pressures for resistance adaptations are reduced. Our findings add to the growing body of literature characterizing the mitochondrial metabolism of many aquatic ectotherms in the context of climate change.

Keywords: Mitochondria, Climate Change, Thermal Sensitivity, Invasive Species, Aquatic Ectotherms

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract	iii
Table des matières.....	iv
Liste des tableaux.....	vi
Liste des figures	vii
Liste des sigles	viii
Liste des abréviations.....	ix
Remerciements.....	xi
Introduction.....	1
1.1 Endothermie, Ectothermie, Température et Patrons de Distribution.....	4
1.2 L’Effet de la Température sur les Mitochondries	8
1.3 Les Moules d’Eau Douce.....	12
1.4 Objectif et Hypothèses.....	15
Thermo-sensibilité mitochondriale chez les moules d’eau douce endémiques et invasives (Article).....	17
Introduction.....	17
Methodology	18
Results.....	28
Discussion	35
Conclusion	42
3 Discussion	44

3.1 Le métabolisme mitochondrial aux trois températures testées	44
3.1.1 À 15°C et 25°C : Des températures considérées non stressantes	44
3.1.2 À 35°C : la dépression métabolique	46
3.1.3 La citrate synthase et le cycle TCA	47
3.2 Réorganisation mitochondriale face à un stress thermique.....	48
3.2.1 Les changement dans les FCR	48
3.2.2 L'activité de la cytochrome <i>c</i> oxydase.....	50
3.2.3 Le « Leak State » à haute température et les protéines découplantes chez les bivalves	51
3.3 La thermo-tolérance et la production de dérivés réactifs d'oxygène.....	55
Conclusion et perspectives futures.....	56
Bibliographie.....	58

Liste des tableaux

Table 1A. Q_{10} values for mitochondrial respiratory capacity in <i>Dreissena bugensis</i> . Values presented as means \pm SEM with $n = 9$	32
Table 1B. Q_{10} values for mitochondrial respiratory capacity in <i>Elliptio complanata</i> . Values presented as means \pm SEM with $n = 12$	32

Liste des figures

<i>Figure 1.</i>	Modèles de prévision d'augmentation de température à travers le 21 ^e siècle. Figure tirée d l'étude du IPCC (2007).....	1
<i>Figure 2.</i>	Température corporelle chez les endothermes et les ectothermes en fonction de la température ambiante. Figure tirée de GEO104 de Gregory S. Paul (University of Maryland) 4	
<i>Figure 3.</i>	Métabolisme chez les endothermes et les ectothermes en fonction de la température ambiante. Figure tirée de Boyles et <i>al.</i> (2011).....	5
<i>Figure 4.</i>	Courbe de performance d'un ectotherme en fonction de sa température corporelle. T _o représente l'optimum thermique. B ₈₀ représente la gamme de température à laquelle les performances de certaines fonctions est égale ou supérieure à 80%. CTMin et CTMax représentent respectivement la température critique minimale et maximale. Ils représentent le spectre de températures à laquelle la performance est possible. Figure tirée de Angilletta et <i>al.</i> (2002).	6
<i>Figure 5.</i>	Système de transport des électrons. Figure tirée de Gnaiger (2014)	9
<i>Figure 6.</i>	Figure a1. Oroboros SUIT protocol used in our experimental design.....	25
<i>Figure 7.</i>	Figure a2. Mitochondrial respiratory capacity measured in permeabilized gills at three different temperatures in <i>Dreissena bugensis</i> (A) and <i>Elliptio complanata</i> (B).	30
<i>Figure 8.</i>	Figure a3. Flux control ratios (FCR) calculated in permeabilized gills at three different temperatures in <i>Dreissena bugensis</i> (A) and <i>Elliptio complanata</i> (B).	31
<i>Figure 9.</i>	Figure a4. CIV apparent excess capacity (j _{EXCIV}) (A) as well as citrate synthase activity (mIU · mg proteins ⁻¹) (B) in both species at the three measured temperatures.....	34
<i>Figure 10.</i>	Activité de protéines découplantes (UCP). Figure tirée de Valle et <i>al.</i> (2010). 53	

Liste des sigles

IPCC: Intergovernmental Panel on Climate Change

IUCN: International Union for the Conservation of Nature

Liste des abréviations

OXPHOS : Phosphorylation oxydative

DRO ou ROS: Dérivés réactifs de l'oxygène

FCR : Ratio de contrôle de Flux

STE ou ETS: Système de transport des électrons

Q : Ubiquinone

Leak : État de fuite

CI : Complexe I

CII : Complexe II

CIII : Complexe III

CIV : Complexe IV

CV : ATP-synthase

U : Respiration découplée maximale

ATP : Adénosine Triphosphate

ADP : Adénosine Diphosphate

H⁺ : Proton

P_i : Phosphate inorganique

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

NAD⁺ : Nicotinamide adénine dinucléotide sous forme oxydée

NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide sous forme réduite

FAD : Flavine adénine dinucléotide

FADH₂ : Flavine adénine dinucléotide sous forme hydroquinone

TMPD : Tétraméthyl-p-phénylènediamine dihydrochloride

Q₁₀ : Coefficient de température

TCA : cycle des acides tricarboxyliques

« Vulgarisé » : Appellation commune ou anglaise

Remerciements

J'aimerais remercier tous les membres du laboratoire de ma directrice Sophie Breton pour l'aide qu'ils m'ont apporté durant les deux dernières années de ma carrière académique. Un remerciement spécial à ma directrice Sophie Breton qui a toujours su me motiver et me pousser à faire du mieux que je pouvais et qui a toujours été très compréhensive et présente. J'aimerais aussi particulièrement remercier Stefano Bettinazzi. Ses commentaires et son expertise dans le sujet m'ont été d'une aide sans mesure. J'aimerais remercier Charlotte Capt qui a cru en moi même avant que je rentre officiellement dans le laboratoire et qui a pris beaucoup de son temps à écouter et réécouter mes pratiques de présentations. Je n'aurai pas pu demander pour une meilleure directrice ni pour des meilleurs collègues de laboratoire à travers mon parcours et plus particulièrement, ma maîtrise. J'aimerais remercier mon co-directeur, Daniel Boisclair, qui m'a donné de son temps précieux malgré son horaire occupé en tant que directeur du département de sciences biologiques de l'UdeM. J'aimerais remercier mes parents, Roger et Gina Hraoui, ma copine, Marie-Pier Baby ainsi que mes amis, Jérémy de Bonville et Guillaume Pilon pour le support moral qu'ils m'ont procuré à travers mes études. Ils et elles m'ont aidé à toujours garder un esprit positif et m'ont encouragé à persévérer. J'aimerais remercier le GRIL pour la bourse de recherche qu'ils m'ont attribué durant ma maîtrise qui m'a permis de me concentrer à temps plein sur mon sujet de recherche et qui m'a donné l'opportunité d'aller faire un stage à Moncton dans le laboratoire du Dr. Nicolas Pichaud. J'ai eu la chance d'apprendre bien des techniques avec le Dr. Pichaud et j'aimerais le remercier ainsi que les membres de son laboratoire pour leur accueil chaleureux ainsi que pour le temps qu'ils m'ont accordé pour m'enseigner des nouvelles méthodes et techniques requises pour compléter mon

stage et qui me seront certainement utiles pour la suite de mon parcours. En fin de compte, j'aimerais remercier les membres de comité conseil ainsi que les membres de mon jury de mémoire pour le temps qu'ils ont investi dans mon projet de maîtrise.

Introduction

Depuis la révolution industrielle, la température globale est en augmentation constante (IPCC, 2007; Walther et *al.*, 2002). Ce phénomène s'accélère progressivement et adopte un rythme inquiétant depuis le début du 20^e siècle (Walther et *al.*, 2002). Plusieurs modèles de prévision ont été émis dans le but de quantifier la hausse de température tout au long du 21^e siècle. Selon une publication émise par le « Intergovernmental Panel on Climate Change » en 2007, où six scénarios de réchauffement climatique ont été étudiés à l'aide de modèles de prévision, est attendue une augmentation de 1,1°C à 6,4°C par rapport aux températures de 1980-1999. En effet, le scénario le plus optimiste prédit que la température n'augmentera que de 1,1°C à 2,9°C tandis que sur le plus pessimiste où la température augmentera de 2,4°C à 6,4°C.

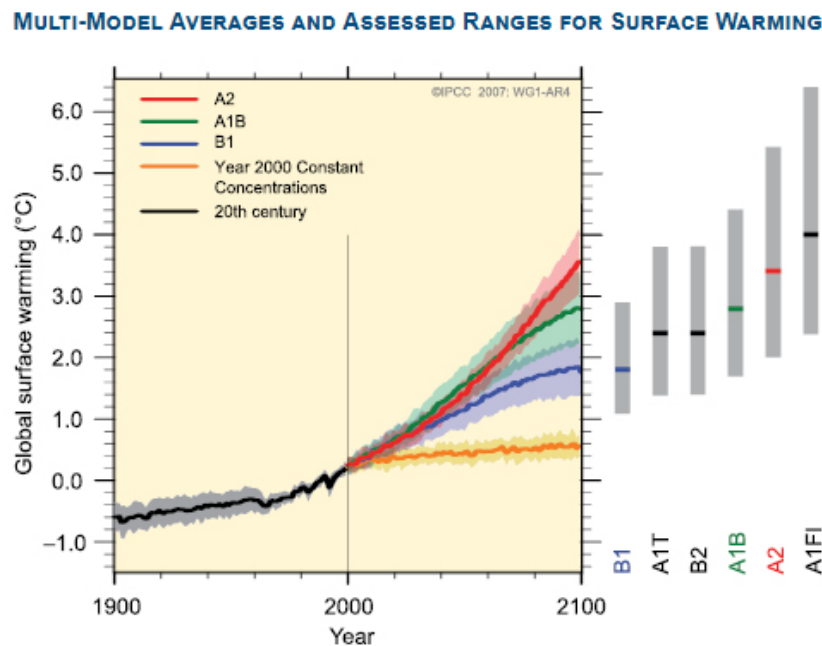


Figure 1. Modèles de prévision d'augmentation de température à travers le 21^e siècle. Figure tirée de l'étude du IPCC (2007)

Les écosystèmes aquatiques et terrestres sont grandement influencés par les changements (et fluctuations) climatiques. Par exemple, au niveau des écosystèmes aquatiques, une augmentation de la température est accompagnée d'une diminution de la solubilité de l'oxygène (Koopman et *al.*, 2016) ainsi que d'une augmentation du niveau de l'eau (IPCC, 2007). Ce type de changement dans l'environnement se fait sentir à différents niveaux.

Premièrement, des avancées récentes ont confirmé un effet de la température environnante sur la phénologie des espèces. En effet, une étude publiée par Menzel et *al.* en 2006 a démontré une corrélation positive entre l'augmentation de la température environnante et les dates de floraison ainsi que la croissance des feuilles et des fruits chez certaines espèces végétales, qui étaient devancées d'une moyenne de 2,5 jours par décennie (base de données sur 21 pays de l'Europe de 1971-2000). De plus, il a été démontré que la température est un facteur primordial dans le développement des œufs de certaines espèces animales aquatiques, avec une corrélation positive entre l'augmentation de la température environnante et le rythme de développement des œufs, ainsi que le taux de mortalité pré-éclosion (Pepin, 1991).

Les changements annoncés peuvent également avoir un effet sur la démographie des espèces, et donc à terme sur leur répartition (Buisson et *al.*, 2008a; 2008b). Les espèces sont adaptées pour la survie dans une gamme spécifique de températures. Un changement de quelques degrés serait assez perturbateur pour forcer certaines espèces à trouver un nouvel habitat qui répond mieux à leurs besoins. Ceci peut être dû aux nécessités strictes de la reproduction (températures clés pour le développement des œufs) ou tout simplement pour la survie à long terme de l'espèce.

Finalement, la température pourrait fortement dicter les interactions entre espèces. Notamment, la relation entre certaines espèces endémiques et invasives peut en partie être expliquée par leur résistance face à des hautes températures (Iftikar *et al.*, 2010; Lockwood *et al.*, 2010). Par exemple, Lockwood *et al.* (2010) avaient remarqué qu'en Californie, sur les côtes centrales et du sud, la moule invasive méditerranéenne *Mytilus galloprovincialis* avait réussi à déloger la moule native *Mytilus trossulus*. Ils ont pu lier (en partie) le succès invasif de *M. galloprovincialis* à la thermo-tolérance de plusieurs de ses fonctions physiologiques et moléculaires. Face à un stress thermique, la réponse de 96 gènes différait entre les deux espèces. La plus grande divergence était dans le gène responsable de la chaperone moléculaire Heat Shock Protein 24 (HSP24). Lockwood et ses collègues avaient ainsi attribué, au moins en partie, une tolérance thermique plus élevée de *M. galloprovincialis* à la réponse divergente interspécifique de ces gènes.

La température influence, soit de façon directe ou indirecte, une quantité énorme de phénomènes et de processus chez les organismes vivants. Ainsi, il est prédit que les espèces vont soit s'adapter aux nouvelles conditions de leur environnement, migrer vers un nouvel environnement où elles sont plus aptes à survivre ou périr face à de trop gros changements se produisant durant une période courte (Van der Putten *et al.*, 2010). Dans une optique de conservation (et aménagement) de la biodiversité, il est donc primordial de mieux comprendre les effets engendrés par des changements de la température chez les organismes, plus particulièrement chez les espèces ectothermes (voir section 1.1), car leur température corporelle est directement contrôlée par l'environnement. Ce type d'études pourrait permettre de mieux prédire les effets présents et éventuels du réchauffement climatique ainsi que la détermination des patrons de distribution des espèces.

1.1 Endothermie, ectothermie, température et patrons de distribution

Chez les animaux, il existe deux manières de réguler la température corporelle. Nous retrouvons les endothermes (les mammifères et oiseaux) et les ectothermes (les reptiles, les amphibiens et les invertébrés). Les endothermes produisent eux-mêmes de la chaleur via leur métabolisme. Leur température interne est donc indépendante de la température ambiante. Chez les ectothermes, l'environnement lui-même sert de source de chaleur. Ils ne peuvent pas en produire de manière endogène. Donc leur température corporelle varie avec celle de l'environnement. (Figure 2).

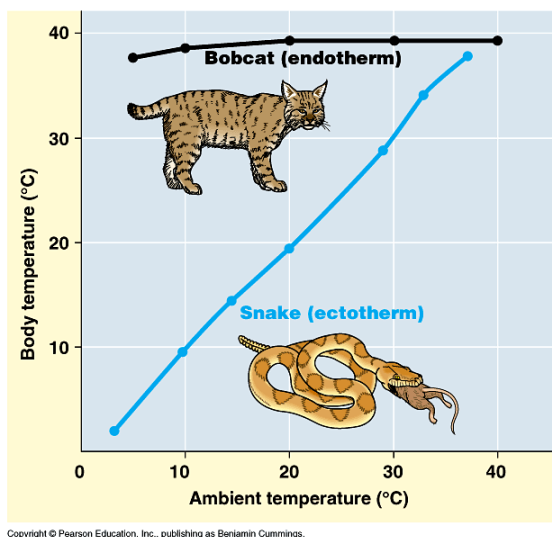


Figure 2. Température corporelle chez les endothermes et les ectothermes en fonction de la température ambiante. Figure tirée de GEO104 de Gregory S. Paul (University of Maryland)

L'endothermie et l'ectothermie présentent des avantages et des inconvénients. Chez les endothermes, la capacité à produire de la chaleur interne grâce à leur métabolisme leur permet de coloniser plusieurs habitats qui seraient hors de portée pour un ectotherme. Par contre, ceci vient avec un coût métabolique élevé (demande en énergie élevée dans le but de produire de la

chaleur). Le métabolisme moyen des endothermes est environ 4 à 5 fois plus élevé que celui d'un ectotherme de taille comparable (Hulbert Else, 1989). Chez les ectothermes, la gamme d'habitats colonisables est plus restreinte que chez les endothermes, mais ils possèdent un avantage dans le fait qu'ils ne dépensent pas d'énergie pour la production de chaleur interne et donc, leurs demandes métaboliques sont moindres que chez les endothermes (Buckley *et al.*, 2012).

Face à des changements de température, le métabolisme des deux groupes réagit de façon très différente (voir Figure 3). Chez les endothermes, il existe une zone de neutralité thermique où les dépenses énergétiques sont quasi nulles pour maintenir leur température corporelle. Une baisse de température à partir du point B sur la figure 3 engendre une augmentation du métabolisme dans le but de maintenir une température corporelle constante (Boyles *et al.*, 2011). Dans le même ordre d'idées, une augmentation de la température passée le point D causera aussi une augmentation, car l'organisme se voit forcé à dissiper activement la chaleur. Le métabolisme des ectothermes est intimement lié à la température environnementale. En effet, plus la température augmente, plus le métabolisme augmente aussi et vice-versa (Boyles *et al.*, 2011).

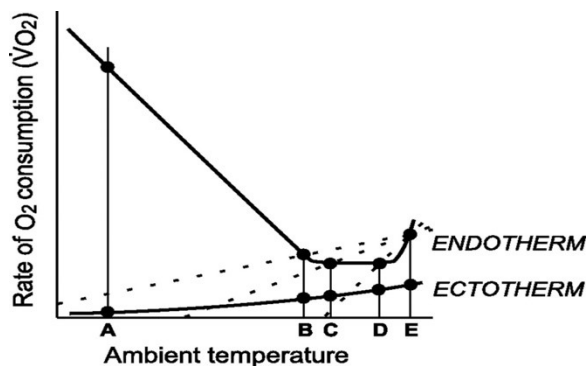


Figure 3. Métabolisme chez les endothermes et les ectothermes en fonction de la température ambiante. Figure tirée de Boyles *et al.* (2011)

Chez les espèces ectothermes, des changements de la température extérieure peuvent donc représenter un obstacle particulièrement difficile à surmonter puisque ceux-ci affectent directement leur température corporelle qui elle-même affecte leur écologie en influençant leur physiologie et leur comportement. Par exemple, il a été démontré que la locomotion, la fonction immunitaire, la transduction de signaux nerveux, la digestion ainsi que le taux de croissance sont tous des processus fortement influencés par la température chez les animaux ectothermes (Angilletta et *al.*, 2002). En fait, face à une large gamme de températures, la relation entre la température du corps et un type spécifique de performance (locomotion ou digestion par exemple) est décrite par une fonction au cours de laquelle la performance est maximale à une température intermédiaire ; on parle de courbe de performance (Voir figure 4). Les courbes de performance sont différentes d'une espèce à l'autre.

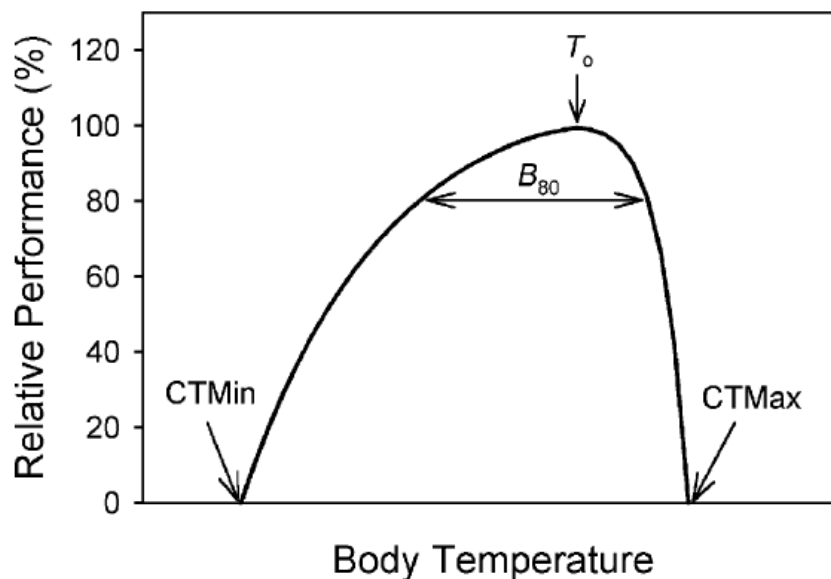


Figure 4. Courbe de performance d'un ectotherme en fonction de sa température corporelle. T_o représente l'optimum thermique. B_{80} représente la gamme de température à laquelle les performances de certaines fonctions est égale ou supérieure à 80%. CTMin et CTMax représentent respectivement la température critique minimale et maximale. Ils représentent le spectre de températures à laquelle la performance est possible. Figure tirée de Angilletta et *al.* (2002).

À ces différences d'optimum thermiques, s'associent des adaptations énergétiques. Par exemple, il est prédit qu'une espèce ectotherme adaptée au froid aura un taux métabolique plus élevé en comparaison avec une espèce vivant en zone tempérée lorsque mesuré à une même température (Guderley et St-Pierre, 2002). Ceci est l'hypothèse de l'adaptation au froid. Brièvement, elle stipule qu'un individu d'une espèce qui se retrouve à des latitudes plus élevées posséderait une activité plus prononcée au niveau de son métabolisme qu'un individu de la même espèce vivant à des latitudes plus basses (au niveau de la respiration mitochondriale, de l'activité enzymatique aérobie comme la citrate synthase ainsi qu'au niveau du métabolisme basal) (White *et al.*, 2011). Cependant, cette augmentation métabolique engendrerait des coûts au niveau de la tolérance thermique. Une adaptation au froid déplace la courbe de performance pour être optimale dans des températures plus froides (vers la gauche sur la figure 4) et ainsi, la thermo-tolérance face aux températures élevées est réduite (White *et al.*, 2011). Même des espèces vivant en sympatrie peuvent présenter des différences de sensibilité thermique puisque l'environnement peut lui-même présenter localement des hétérogénéités thermiques importantes. Il est donc peu étonnant que la température soit reconnue comme un facteur clé déterminant la distribution géographique des espèces (Van der Putten *et al.*, 2010).

Ainsi, déterminer les sensibilités thermiques et adaptations de thermorégulation et métaboliques des espèces ectothermes constitue non seulement une étape importante pour comprendre leurs capacités de réponse à court et à long terme aux changements de température, mais aussi pour expliquer leur distribution géographique actuelle et permettre éventuellement de prédire leurs patrons de distribution futurs.

1.2 L'Effet de la température sur les mitochondries

Le métabolisme aérobie est alimenté par le système de transport des électrons (STE) intégré dans la membrane interne mitochondriale et qui transfère les électrons à l'oxygène, générant ainsi un gradient de protons utilisé par l'ATP synthase pour phosphoryler l'ADP en ATP (phosphorylation oxydative ou OXPHOS). Spécifiquement, le STE se compose de quatre complexes protéiniques (voir Figure 5) : (1) le complexe I (NADH deshydrogénase) qui reçoit 2 électrons de la part du NADH (NADH à NAD^+). Il transfère ces électrons à l'Ubiquinone (Q) permettant au complexe I de faire passer 4 protons à travers la membrane de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire; (2) le complexe II (Succinate deshydrogénase) qui reçoit 2 électrons de la part du FADH_2 (FADH_2 à FAD). Ces électrons sont transférés à Q sans passage de protons; (3) le complexe III (ubiquinol-cytochrome *c* oxidoreductase) qui reçoit les électrons par l'entremise d'un transfert de Q. Pour chaque électron qui lui est passé, le complexe III fait passer 2 protons à travers la membrane. Ces électrons sont finalement transférés au cytochrome *c* pour se rendre au (4) complexe IV (Cytochrome *c* oxidase) qui reçoit tous les électrons ayant été acheminés au cytochrome *c*. Suite à cela, l'accepteur final d'électrons, l' O_2 , est réduit en acceptant quatre électrons pour se transformer en molécule d'eau ($4\text{H}^+ + \text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O}$). Au complexe IV, ce processus permet le passage de 4 protons à travers la membrane (un pour chaque électron reçu) (Gnaigner, 2014). Le gradient de protons ainsi formé entre la matrice mitochondriale et l'espace intermembranaire alimente le complexe V (ATP synthase). Ce dernier nécessite trois éléments pour fonctionner : l'ADP, du Phosphate inorganique (P_i) et des protons (H^+). En pompant quatre protons de l'espace intermembranaire vers l'intérieur de la mitochondrie, le complexe V permet la production d'ATP ($\text{ADP} + \text{P}_i$ avec $4\text{H}^+ \rightarrow \text{ATP}$). (Gnaigner, 2014). Il est important de noter que la membrane mitochondriale laisse

aussi passer des protons contre le gradient voulu. Ceci se nomme la fuite de proton (« Proton Leak » en anglais). Lorsqu'on mesure seulement cette fuite, nous nommons cette variable mesurée le « Leak State » ou état de fuite.

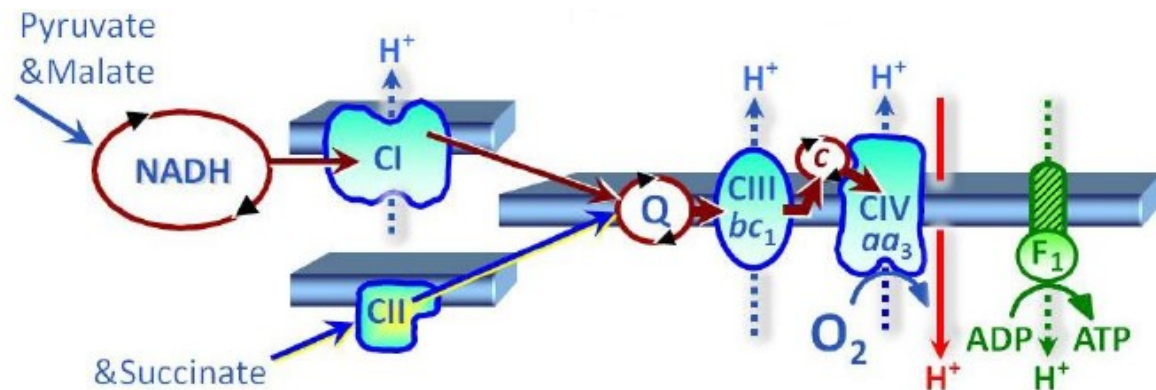


Figure 5. Système de transport des électrons. Figure tirée de Gnaiger (2014)

La température affecte profondément les réactions métaboliques aérobies menant à la production d'ATP par la machinerie mitochondriale, car les protéines et enzymes responsable du métabolisme peuvent subir des dénaturations à haute température (baisse de performance) À très basse température, nous pouvons observer un ralentissement du métabolisme, car la vitesse des réactions métaboliques varie avec la température chez les ectothermes (Boyles *et al.*, 2011). Les réponses des mitochondries aux changements de température peuvent se produire à différentes échelles de temps dans les populations naturelles d'ectothermes aquatiques.

À long terme (réponse évolutive ou adaptation), des changements remarquables peuvent se produire au niveau mitochondrial. Par exemple, chez les bivalves du genre *Protothaca*, Clarke (2003) avait noté un compromis évolutif au niveau de leur traits de vie (Life history traits). Les individus vivant à des latitudes plus basses (donc à des températures plus élevées) possédaient

des métabolismes mitochondriaux plus élevés en comparaison avec des individus à des hautes latitudes. Selon Clarke, il y avait deux explications pour cela. En premier lieu, aux latitudes plus basses, les bivalves pouvaient se nourrir pendant une plus longue période de l'année et avaient donc accès à plus de ressources, ce qui leur permettait de maintenir un métabolisme plus élevé. Cependant, la température à laquelle ils vivaient augmentait naturellement leurs besoins énergétiques et donc, ils ne se retrouvaient pas dans une situation plus avantageuse que leurs congénères du nord. De plus, cette augmentation du métabolisme avait été associée avec des compromis au niveau de la digestion, de la reproduction ainsi que plusieurs autres fonctions relatives au maintien de l'organisme. Clarke avait remarqué que les individus adaptés à des températures plus froides allouaient moins d'énergie à la maintenance de l'organisme et pouvaient ainsi distribuer une plus grande part aux autres fonctions essentielles. Malgré un accès à une source de nourriture plus abondante, les demandes énergétiques engendrées par des températures élevées ont forcé une adaptation du métabolisme mitochondrial au détriment de plusieurs autres fonctions ainsi que la durée de vie chez les bivalves du genre *Protothaca* (Clarke, 2003). Chez les ectothermes, un métabolisme mitochondrial élevé a déjà été associé avec une augmentation de la production de dérivés réactifs de l'oxygène (DRO) (Abèle *et al.*, 2002). Les DRO sont des molécules très réactives à base d'oxygène telles que les radicaux libres (i.e. OH.), des ions oxygénés (i.e. O_2^-) et des peroxydes (i.e. H_2O_2). Une production excessive de ces molécules causée par une exposition à long terme à une température élevée peut causer des dommages à l'ADN et l'ARN, l'oxydation des acides aminés présents dans les protéines ainsi que la désactivation de certaines enzymes (Brooker, 2011). Ainsi, le compromis présenté plus haut représenterait peut-être un changement d'un trait d'histoire de vie dans le but

d'augmenter le fitness des bivalves (augmentation métabolique pour subvenir aux besoins plus grands en échange d'une plus courte durée de vie).

Dans le même ordre d'idées, à court ou moyen terme (acclimatation), on peut observer des ajustements mitochondriaux à plusieurs niveaux. Par exemple, selon Guderley et St-Pierre (2002), des poissons vivant dans des environnements tempérés démontrent une augmentation de la quantité de mitochondries retrouvées dans les muscles rouges et blancs lorsqu'ils sont acclimatés à 5°C. Cette augmentation de la quantité de mitochondrie pourrait être due à la baisse des capacités de phosphorylation oxydative mitochondriale face à de basses températures. De plus, l'acclimatation à une température autre que celle retrouvée dans l'environnement de l'espèce affecte fortement l'activité enzymatique mitochondriale. Par exemple, dans le STE, l'activité de la cytochrome c oxydase est fortement affectée par la température à laquelle l'animal est acclimaté. L'activité de cette enzyme est remarquablement plus élevée avec l'acclimatation au froid (Blier et *al.*, 2013; Guderley et St-Pierre, 2002). Ainsi, les fluctuations de température à court et moyen terme produisent des changements non seulement au niveau de la densité mitochondriale, mais aussi au niveau de l'activité enzymatique, de l'affinité envers des substrats spécifiques ainsi que la composition des membranes (Guderley et St-Pierre, 2002 pour une revue de la littérature).

Considérant l'éventail des fonctions qui bénéficient de l'énergie produite par les mitochondries, ainsi que les fonctions effectuées par les mitochondries elles-mêmes (ex. non seulement OXPHOS mais aussi régulation calcique, synthèse de stéroïdes, apoptose, etc.), il est certain que la sensibilité thermique des mitochondries est d'une importance capitale dans la capacité d'un animal à coloniser des habitats thermiques spécifiques et de tolérer ou s'adapter à des variations de températures plus ou moins longues (Blier et *al.*, 2013). Par exemple, une

étude publiée en 2010 par Iftikar et *al.* portant sur deux espèces de crabes présents sur les rivages de la Nouvelle Zélande, soient le crabe invasif *Charbydis japonica* et le crabe endémique *Ovalipes catharus*, s'est intéressée à savoir si la distribution des deux espèces pouvait être définie par leur tolérance thermique. En mesurant le métabolisme mitochondrial et le rythme cardiaque à différentes températures, les auteurs ont démontré que l'espèce invasive *C. japonica* possédait des mitochondries plus résistantes face à de hautes températures. Ils ont donc émis l'hypothèse que le succès invasif de ce crabe pouvait être en partie lié à ses mitochondries résistantes, et que dans un contexte de réchauffement climatique, *C. japonica* devrait avoir un avantage compétitif par rapport à *O. catharus* (Iftikar et *al.* 2010).

Malgré la fonction bioénergétique centrale des mitochondries et leur association étroite avec la plupart des traits d'histoire de vie, peu d'études se sont intéressées aux adaptations spécifiques du métabolisme mitochondrial requises pour assurer l'homéostasie dans différentes conditions environnementales et thermiques.

1.3 Les moules d'eau douce

Contrairement aux espèces mobiles pouvant esquiver les conditions défavorables, les espèces sessiles qui vivent fixées sur des substrats, sont un groupe particulièrement à risque face au réchauffement climatique et aux perturbations anthropiques. Parmi les espèces sessiles à risque, les moules d'eau douce (ordre Unionida) se retrouvent partout à travers le monde, sauf en Antarctique, avec une biodiversité plus importante en Amérique du Nord et en Asie du Sud où >670 espèces ont été répertoriées (Graf et Cummings, 2007; Williams et *al.*, 1993). Les unionidés sont parmi les animaux avec une espérance de vie la plus longue, atteignant parfois plus d'une centaine d'années (Anthony et *al.*, 2001). Leur rôle écologique considérable procure

plusieurs avantages à l'homme et à l'environnement. En moyenne, une moule d'eau douce adulte de 61mm peut filtrer environ 25L d'eau par jour (Vaughn *et al.*, 2008). Considérant leur population, les moules d'eau douce filtrent une quantité énorme d'eau. Effectivement, en filtrant des algues, des bactéries et de la matière organique, les moules d'eau douce améliorent la qualité de l'eau tout en causant un transfert d'énergie de la zone pélagique au benthos. Par conséquent, elles ont un effet remarquable au niveau de la chaîne trophique. De plus, elles sont une proie importante pour plusieurs poissons commerciaux (Lopes-Lima *et al.*, 2017).

Malgré leur grande diversité, selon le « International Union for the Conservation of Nature » (IUCN), près de 50% des espèces connues sont classifiées comme étant menacées ou proches de l'être tandis qu'en Amérique du Nord, 70% des espèces sont menacées et 37 espèces sont considérées déjà éteintes (<http://www.iucnredlist.org/>, consulté le 31 juillet, 2019).

Certaines hypothèses ont été émises pour essayer d'expliquer le phénomène de disparition des moules d'eau douce. Outre le réchauffement climatique (Lopes-Lima *et al.*, 2017), la pollution est considérée comme un élément possiblement responsable du déclin de certaines populations. En effet, les glochidies (stade larvaire parasite de poissons) et les juvéniles de moules sont particulièrement affectés par les pesticides industriels déversés dans les lacs et les rivières. Ces pesticides peuvent causer un arrêt du développement des stades larvaire et juvénile. Ne pouvant pas atteindre le stade de reproduction, les populations d'unionidés peuvent ainsi chuter (Bringolf *et al.*, 2007). De plus, les espèces invasives telles que la moule zébrée *Dreissena polymorpha* et la moule Quagga *Dreissena bugensis* peuvent engendrer une baisse de population des unionidés par compétition directe pour les mêmes ressources et pour le territoire (Karatayev *et al.*, 1997).

La moule Quagga (*D. bugensis*) est un bivalve d'eau douce de la famille des Dreissenidae (ordre Myoida) et elle est originaire d'Europe de l'est (Karatayev *et al.*, 1997). Elle a pu se propager à travers l'Europe et l'Amérique du Nord en s'attachant aux coques des bateaux ou encore en voyageant dans les eaux de ballast. C'est une espèce de moule extrêmement invasive, pouvant atteindre une biomasse dix fois plus élevée que tout autre invertébré benthique endémique lorsqu'elle s'installe dans un environnement (Karatayev *et al.*, 1997). Une des explications à son succès colonisateur serait qu'elle surpasse les autres espèces de moules d'eau douces (les unionidés) dans les environnements pollués ou riches en algues bleues car elle bénéficie d'un mécanisme de détoxification et de filtration extrêmement efficace (Ludyanskiy *et al.*, 1993). Elle possède également une forte fécondité et une capacité de dispersion larvaire importante (Ram *et al.*, 1996). De plus, elle se fixe souvent sur les coquilles de grandes moules d'eau douce unionidés, ce qui finit par empêcher ces dernières de se nourrir (Karatayev *et al.*, 1997). Tous ces facteurs peuvent entraîner une réduction drastique des populations de moules natives unionidés. Au Québec, la moule Quagga côtoie certaines espèces unionidés endémiques dont l'elliptio de l'Est (*Elliptio complanata*) et la lampsile siliquoïde (*Lampsilis siliquoidea*) qui sont parmi les espèces les plus largement réparties de la province (Paquet *et al.* 2005).

Une étude publiée en 2013 par Gallardo & Alridge visait à évaluer l'effet combiné du réchauffement climatique et de la présence d'espèces de bivalves invasives sur des espèces endémiques d'unionidés menacées. Spécifiquement, en utilisant un ensemble d'algorithmes différents (ENFA, GARP, Maxent, SVM, GLM, GBM & RF), l'étude a produit plusieurs scénarios de l'an 2050 dans lesquels l'effet combiné du réchauffement climatique et d'espèces invasives (dont la moule zébrée *D. polymorpha*, un cousin proche de la Quagga) a été évalué

sur les populations menacées de *Pseudanodonta complanata*, une espèce cousine européenne d'*Elliptio complanata*. Les résultats ont démontré qu'à travers tous les scénarios considérés, *D. polymorpha* aurait une augmentation de territoire de 15-20% tandis que *P. complanata* subirait une perte territoriale de 14-36%. Selon les modèles de prévision de Gallardo et Aldridge (2013), les deux facteurs impliqués (température & compétition) auraient donc un effet particulièrement néfaste sur les moules unionidés. Bien qu'il existe des études de modélisation de l'impact d'un réchauffement climatique sur les populations de moules dreissenidés et/ou unionidés (Bossenbroek *et al.*, 2007; Hastie *et al.*, 2003), les études expérimentales testant les effets d'une augmentation de la température sur la physiologie des moules d'eau douce sont plutôt rares (ex. Verbrugge *et al.*, 2011).

1.4 Objectif et hypothèses

Plusieurs études confirment un lien possible entre le succès invasif d'une espèce et la résistance de son métabolisme aérobie face à la chaleur (Iftikar *et al.*, 2010; Lockwood *et al.*, 2010; Lockwood *et al.*, 2011). Cependant, aucune étude de ce genre n'a été réalisée sur des moules invasives et des moules endémiques. Ainsi, l'objectif de ce projet vise à tester si les mitochondries de l'espèce invasive *Dreissena bugensis* sont plus robustes face à des températures élevées en comparaison aux mitochondries de l'espèce endémique *Elliptio complanata*. Des études antérieures ont placé la température critique maximale de l'*elliptio* de l'est entre 38-40°C (Galbraith *et al.*, 2012; Martin, 2016). Similairement, la moule Quagga peut tolérer des températures allant jusqu'à 39°C pendant plusieurs heures (Choi *et al.*, 2013). Si le succès invasif de la moule Quagga peut partiellement être expliqué par la thermo-tolérance de ses fonctions mitochondriales, nous nous attendons à ce que ses mitochondries soient plus

robustes face à des températures élevées en comparaison avec celles de *E. complanata*. Ceci pourrait potentiellement (et partiellement) expliquer les résultats obtenus par Gallardo & Aldridge (2013) sur l'effet combiné des changements climatiques et espèces invasives sur la perte de territoire prédite du cousin unionidé proche *P. complanata*.

Thermo-sensibilité mitochondriale chez les moules d'eau douce endémiques et invasives (Article)

Georges Hraoui^{1,2,*}, Stefano Bettinazzi¹, Andrée D. Gendron³, Daniel Boisclair^{1,2} & Sophie Breton^{1,2,*}

¹ Département de Sciences Biologiques, Université de Montréal, Pavillon Marie-Victorin, 90 Vincent D'Indy, Montréal, QC, Canada

² Groupe de Recherche Interuniversitaire en Limnologie (GRIL), Université de Montréal, Pavillon Marie-Victorin, 90 Vincent D'Indy, Montréal, QC, Canada

³ Aquatic Contaminants Research Division, Water Science and Technology Directorate, Environment and Climate Change Canada, 105 McGill, Montréal, QC, Canada

Summary

Climate change is impacting many, if not all, forms of life. Increases in extreme temperature fluctuations and average temperatures can cause stress, particularly in aquatic sessile ectotherms such as freshwater mussels. However, some species seem to thrive more than others in face of temperature-related stressors. Thermal tolerance may for example explain invasive species success. It is also known that mitochondria can play a key role in setting an ectothermic species' thermal tolerance. In this study, we aimed to characterize the mitochondrial thermo-tolerance in invasive and endemic freshwater mussels. With the use of high-resolution respirometry, we analyzed the mitochondrial respiration of two freshwater bivalve species exposed to a broad range of temperatures. We noticed that the invasive dreissenid *Dreissena bugensis* displayed a less thermo-tolerant mitochondrial metabolism than the endemic unionid *Elliptio complanata*. This lack of tolerance was linked with a more noticeable depression of aerobic metabolism at elevated temperatures. These findings may be associated with the life history traits of both species, as *D. bugensis* is more adapted to unstable habitats, where selection pressures for resistance adaptations are reduced. Our findings add to the growing body of

literature characterizing the mitochondrial metabolism of many aquatic ectotherms in the context of climate change.

Introduction

One of the greatest challenges faced by organisms in our time is climate change. Predictive models have estimated that by the end of the 21st century, average temperatures will be 1.5-5°C higher than present (Rogelj *et al.*, 2012; Bush & Lemmen, 2019). Alongside the increase in average temperatures, climate change is expected to result in an increase in extreme temperature fluctuations (Vasseur *et al.*, 2014). Aquatic ectotherms are particularly susceptible to these changes, as their metabolic processes are intimately related to environmental temperatures, and many ectotherms already live close to their upper thermal limit (Nguyen *et al.*, 2011). In comparison with motile animals such as fish which can attempt to mitigate the negative effects of elevated temperatures by migrating into cooler areas (Buisson *et al.*, 2008a; Buisson *et al.*, 2008b), sessile ectotherms, such as bivalves, are at the whims of their local habitat.

Susceptibility of aquatic ectotherms to climate change has been suggested to be inherently linked to mitochondria (Blier & Lemieux, 2001), as these small organelles, present in most eukaryotic cells, are sensitive to environmental temperatures and are key regulators of cellular energy metabolism. Energy in the form of ATP is indeed produced mainly in mitochondria through a process known as oxidative phosphorylation (OXPHOS). As such, disruption of metabolic processes by elevated temperatures has often been associated with failure of multiple functions and often, in more extreme cases, death (Schulte, 2015). While it is generally known that mitochondrial thermal sensitivity mediates metabolic failure at high

temperatures, the exact way in which this occurs is less understood due to the complex metabolic synergies and interactions found in organisms (Schulte, 2015). Temperature sensitivity of various metabolic processes varies wildly from species to species (Blier & Lemieux, 2001). Consequently, while some species may suffer greatly from climate change, others may not be affected as much and may even thrive under these new conditions due to lesser competition from more temperature sensitive species. Mitochondrial thermal sensitivity becomes particularly relevant in the context of invasive species and climate change, as some of these may profit from the newfound conditions. Invasive success has already been associated with an elevated resistance to high temperatures in some aquatic ectotherms such as fish and marine bivalves (Lockwood *et al.*, 2010; Lockwood *et al.*, 2011; Bates *et al.*, 2013), and more thermostable mitochondria in particular have been shown to advantage invasive crab species (Iftikar *et al.*, 2010). However, no such studies have been conducted on invasive and endemic freshwater mussels.

North American freshwater mussels (Bivalvia: Unionida) are already greatly imperiled, with ~70% of the nearly 300 species being of special concern, threatened, endangered or even extinct (Williams *et al.*, 1993; Lydeard *et al.*, 2004). As these provide many ecological functions and services (Lopes-Lima *et al.*, 2017), the wellbeing and maintenance of established populations is critical to a healthy aquatic environment. Studies suggest that unionid mussels are imperiled due to their limited dispersal and mobility, habitat destruction and pollution, a complex life cycle involving a fish host, and their susceptibility to the effects of introduced/invasive species (Strayer *et al.*, 2004; Ganser *et al.*, 2015). Research on their thermal tolerances also suggests that many species may already be living close to their upper thermal limits (Pandolfo *et al.*, 2010; Ganser *et al.*, 2015). Some studies indicated that some North

American native freshwater mussels may be more robust to elevated temperature than previously reported (Galbraith *et al.*, 2012; Martin, 2016). For example, Gallardo & Aldridge (2013) modelled the combined effect of climate change and invasive species (including the zebra mussel *Dreissena polymorpha*) on European endemic unionid species (such as *Pseudanodonta complanata*) and predicted that, by 2050, the zebra mussel would gain up to 15-20% territory while the endemic unionid mussel would suffer territorial losses of up to 14-36%.

Several studies have shown the effects of elevated water temperatures on various physiological processes in freshwater mussels, including oxygen consumption, ammonium excretion, heart rate, and enzymatic activities (e.g. Doucet-Beaupré *et al.*, 2010; Ganser *et al.*, 2015). In north American native species for example, oxygen consumption and ammonium excretion were shown to increase with temperature to levels that led Ganser *et al.* (2015) to suggest that these alterations could decrease the amount of energy available for key biological processes, such as survival and reproduction. To our knowledge, however, research on mitochondrial thermal sensitivity of invasive and endemic freshwater mussel species is very limited. In the present study, we investigated the mitochondrial metabolic response of two north American invasive and endemic species respectively exposed to elevated temperatures to assess whether mitochondrial thermal sensitivity plays a role in determining invasion success in freshwater mussels. We hypothesize that if a successful invasion is partly explained by thermal tolerance of mitochondrial function, we can expect that their mitochondria will be more robust at elevated temperatures in invasive species.

Methodology

Experimental strategy

The strategy used to achieve our objectives consisted in collecting bivalves from natural ecosystems and conducting mitochondrial respiration assays to assess whether mitochondria from invasive species are more robust at elevated temperatures relative to native species. Specifically, two freshwater bivalves, *i.e.* the north American endemic unionid species *Elliptio complanata* (eastern elliptio) and the invasive quagga mussel *Dreissena bugensis*, were exposed to elevated temperatures to determine whether mitochondrial thermal sensitivity might play a role in the invasive success of the quagga mussel. The eastern elliptio is a well-established species in the Canadian province of Quebec (Paquet *et al.*, 2005; Picard & Houle, 2011), and is actually considered stable throughout most of its range (eastern Canada and United states; Cummings & Cordeiro, 2011). Previous studies suggested that the eastern elliptio is rather thermo-tolerant, with critical thermal maximum for adults reaching 38-40°C (Galbraith *et al.*, 2012; Martin 2016). The quagga mussel *D. bugensis* is an invasive species originally from eastern Europe (Mills *et al.*, 1993) that has prospered and colonized many aquatic environments in Quebec, much to the detriment of native species (Sala *et al.*, 2000). Similar to *E. complanata*, the quagga mussel can tolerate high temperature (up to 39°C) for hours (Choi *et al.*, 2013). However, while the thermal tolerance of both species has been studied at the whole organism level, no comparable data are available for both species at the cellular level. For example, if the invasive success of *D. bugensis* is partly explained by thermal tolerance of mitochondrial function, we can expect that its mitochondria will be more robust at elevated temperatures relative to *E. complanata*. This could partially explain the predictions obtained by Gallardo &

Aldridge (2013) on the combined effect of climate change and invasive species on endemic unionid species (i.e. a loss in territory of the close unionid cousin *P. complanata* and a gain of territory of the closely-related invasive zebra mussel).

Experimental animals

Adult specimens of both *Elliptio complanata* and *Dresseina bugensis* were collected from the St. Lawrence River basin, respectively in Lake Hertel (45.542454°; -73.154006°) and Pointe-des-Cascades (45.331500°; -73.968033°) under conditions specified in provincial permit no 2018-04-16-2398-06-16-S-P and 2018-5-15-2439-16-05-S-P. While *E. complanata* were simply removed by hand from the sediment where they were partly buried, *D. bugensis* were gently cut off from the substrates they were attached to using a scraper. Mussels were acclimated for a minimum of 6 weeks at the Environment and Climate Change Canada facilities where they were maintained at $15 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ under a 16h light/8h dark cycle in aquaria filled with dechlorinated and UV-treated tap water (City of Montréal, QC. Canada) under constant aeration. Water was renewed every two weeks and mussels were fed three times per week with concentrates of phytoplankton (Phytoplex, Kent Marine, WI) and *Pseudokirchneriella subcapitata* algal preparations until being transferred to the University of Montreal laboratories where the mitochondrial respiration assays were performed. There, the mussels were placed in an aerated aquarium with dechlorinated water kept at $15 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ and feeding was suspended. Experiments ensued 24h after arrival.

Mitochondrial respiration

E. complanata ($n = 12$ with n representing one individual's gills) and *D. bugensis* ($n = 9$) were put on ice prior to dissection. Once on ice, the mussels were opened with a sterilized Shucker's knife and the gills were dissected and immediately placed on ice in an Eppendorf containing *Biopsy Preservation Solution* [BIOPS: CaK₂EGTA (2.77 mM), K₂EGTA (7.23 mM), MgCl₂·6H₂O (6.56 mM), taurine (20 mM), Na₂phosphocreatine (15 mM), imidazole (20 mM), dithiothreitol (0.5 mM), MES hydrate (50 mM), Na₂ATP (5.77 mM), at pH 7.10]. Before experimentation, the gills were removed from the Eppendorf and mechanically permeabilized with fine tweezers (Kuznetsov *et al.*, 2002) and further chemically permeabilized with saponin (50 µg.mL⁻¹ BIOPS) as described by Lemieux *et al.* (2017). Each sample was then rinsed for 15 minutes in a mitochondrial respiration medium (RM), weighed (approximately 15-30 mg) and transferred into 2 mL chambers containing O₂-saturated RM [110 mM D-sucrose, 60 mM lactobionic acid, 20 mM taurine, 20 mM HEPES, 10 mM KH₂PO₄, 3 mM MgCl₂, 0.5 mM EGTA, BSA 1 g·L⁻¹; Gnaiger *et al.* (2000)] at 15°C, 25°C and 35°C in an Oroboros Oxygraph-2kTM respirometer (Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria). Mitochondrial respiration was measured as volume-specific oxygen flux [pmol O₂·(s·mL)⁻¹] using the DatLab Software V 5.2.1.51 (Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria). Mitochondrial respiration was assessed using the substrate- inhibitor titration (SUIT) protocol proposed by Kake-Guena *et al.* (2015, 2017), with the following modifications: glutamate was added to the protocol and a mitochondrial uncoupler (FCCP) was introduced following succinate addition (**Fig. 1**). Specifically, the titration protocol consisted of mitochondrial NADH dehydrogenase (complex I or CI) substrates glutamate (24 mM), pyruvate (10 mM) and malate (2 mM) to measure state 2' respiration through CI in absence of ADP (denoted "Leak State") (Gnaiger, 2014). Excess

ADP (5 mM) was added to stimulate oxidative phosphorylation (Oxphos-I) or state 3 respiration. Cytochrome *c* (10 μ M) was added to calculate the flux control factor for cytochrome *c* (FCF_{*c*}) to determine mitochondrial membrane integrity (an increase in rate following cytochrome *c* addition is indicative of outer mitochondrial membrane damage) (Gnaiger, 2014). Specifically, values close to 0 represent an undamaged mitochondrial membrane while values nearing 1 represent a fully damaged mitochondrial membrane (Kake-Guena *et al.*, 2017). Then, succinate (10 mM) was then added to stimulate succinate dehydrogenase (complex II or CII) activity. This allowed the measurement of respiration sustained by CI- and CII-linked substrates together (Oxphos-I-II). To test for limitation by the phosphorylation system and to measure the maximal flux of the electron transport system (ETS), mitochondrial respiration was uncoupled using carbonyl cyanide-p-(trifluoromethyl)phenylhydrazone (FCCP, 0.5 μ M) addition. The uncoupled respiration sustained by CII was determined through addition of the CI inhibitor rotenone (1 μ M). The residual oxygen consumption was further determined through antimycin A addition (2.5 μ M), an inhibitor of complex III. Cytochrome *c* oxidase activity was measured by the addition of ascorbate (2 mM) and TMPD (0.5 mM). Sodium azide (100mM) was then added to inhibit CIV activity and measure auto-oxydation of TMPD. The chamber contents were then recuperated, homogenized for 3 x 30 s with a PT 1200 homogenizer (Polytron, Kinematica) at maximal velocity and stored at -80°C for further enzymatic analyses.

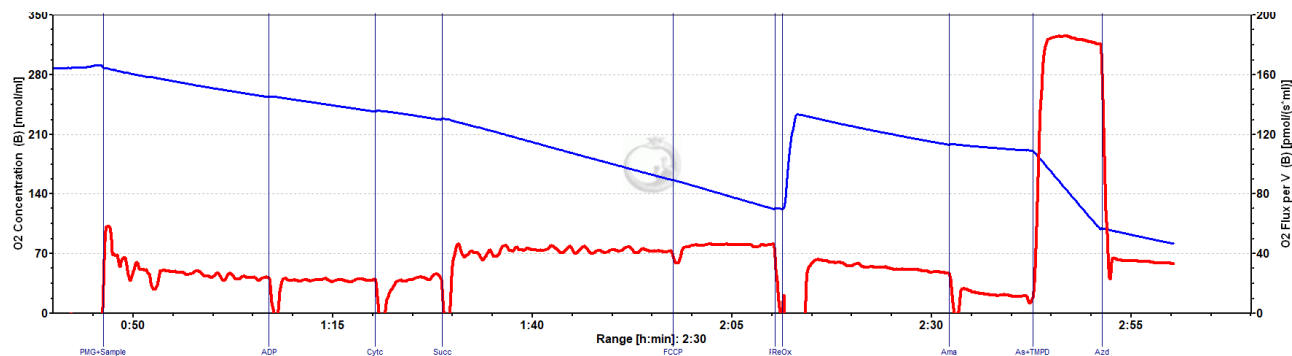


Figure 6. Figure a1. Oroboros SUIT protocol used in our experimental design.

The addition of pyruvate, malate and glutamate (P, M & G respectively) allows us to measure the Leak state. Adding ADP (ADP) afterwards gives us CI-sustained respiration rate. Cytochrome *c* (Cytc) addition tests for membrane integrity. Addition of succinate (Succ) allows for combined measurement respiratory rates sustained by both CI and CII-linked substrates. FCCP (FCCP) uncouples the OXPHOS and allows maximal ETS respiration rates. Rotenone (Rot) inhibits CI for CII measurement. Antimycin (Ama) inhibits CIII and all upstream complexes. Addition of Ascorbate and TMPD (As & TMPD respectively) allows us to feed CIV independently of the rest of the ETS and measure CIV rates. The use of sodium azide (Azd) inhibited CIV. The blue line indicates O₂ concentration (as shown by the left y axis) and the red line indicates O₂ flux (as shown by the right y axis).

Protein content

To normalize our mitochondrial respiration data, the protein concentration ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) of our homogenized chamber contents containing the mitochondrial respiration samples was determined with a bicinchoninic acid (BCA) assay kit (Sigma BCA1-1KT), which used a bovine serum albumin (BSA) based standard curve. The absorbance was measured at a wavelength of 560 nm using a Mithras LB940 microplate reader (Berthold technologies, Bad Wildbad, Germany).

Citrate synthase activity

Citrate synthase (CS) activity was measured because it is an important player in the tricarboxylic acid cycle (TCA) that allows to estimate the mitochondrial content in our tissue samples (Breton *et al.*, 2009). CS activity was assessed in triplicates with a Mithras LB940 microplate reader at each of the three respiration assay temperatures (15 °C, 25 °C and 35 °C), and the data were analyzed using the MikroWin 2010 V 5.15 software (Labsis Laborsysteme, Neunkirchen-Seelscheid, Germany). Specifically, homogenized chamber contents containing the mitochondrial respiration samples (125 μ L) were transferred to 100 mM imidazole-HCL pH 8, 0.1mM 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) alongside 0.1 mM acetyl-CoA and 0.15 mM oxaloacetate. CS activity was quantified by observing the increase in absorbance at a wavelength of 405 nm. Our data were expressed in mIU·mL⁻¹, where IU refers to 1 μ mol of substrate transformed per minute.

Chemicals

All chemicals were obtained from Sigma-Aldrich (Oakville, Ontario, Canada).

Data analysis

Mitochondrial respiratory rates were expressed in pmol-O₂-consumed·s⁻¹·mg protein⁻¹ \pm standard error of the mean (SEM). Flux control ratios (FCRs) were obtained by normalizing respiratory rates for an internal parameter: the maximal ETS capacity (U). This was achieved after FCCP-mediated uncoupling (Gnaiger, 2014) with parallel electron flow coming from CI + CII. This allowed us to qualify the relative capacity of each measured complex (CI, CII and CIV) over the maximal respiratory capacity of the mitochondria, a character dictated by

mitochondrial properties instead of mitochondrial content (Gnaiger, 2014; Lemieux *et al.*, 2017). CIV apparent excess capacity (j_{EXCIV}), which allows us to quantify cytochrome *c* oxidase activity exceeding the max ETS capacity, was calculated as $(\text{CIV} \cdot \text{U}^{-1}) - 1$. Citrate synthase activity was expressed in $\text{mIU} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{mg protein}^{-1}$. Temperature coefficient values [$Q_{10} = (\text{rate}_2 \cdot \text{rate}_1^{-1})^{10/(t_2 - t_1)}$], which represents the change in respiratory rates following an increase in temperature of 10°C, were calculated for 15-25 °C as well as 25-35 °C. While a value of 1 indicates thermal independence of the specific reaction, higher or lower values respectively indicate positive or negative thermal dependence (Pisek *et al.*, 1973). Q_{10} values for each individual specimen were calculated and then pooled to calculate the mean \pm SEM at each temperature for each species.

Statistical analysis

All statistical analyses were performed with R-studio software (R Core Team, 2016). Normality of data was verified using the Shapiro-Wilk test. The Levene's test was used to verify homogeneity of variance. One independent factor was considered: 'temperature' (3 levels). For each species, the effect of temperature was ascertained using a one-way repeated-measure ANOVA (with each individual's data paired at all temperatures) followed by a *post hoc* pairwise *t* test with correction for multiple comparisons using the Holm's method. A $P \leq 0.05$ was considered statistically significant. Figures were produced with Graphpad Prism software (GraphPad Prism version 8.0.1 for Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA).

Results

Mitochondrial respiration

Comparison of mitochondrial respiration rates (normalized per mg of protein) for *Dreissena bugensis* at the three temperatures (**Fig. a2A**) showed that they were almost always lower at 15°C than 25°C, but the only statistical significance was denoted for CIV ($P = 0.03$). Respiration rates for *D. bugensis* were also significantly lower for most complexes at 35°C than at 25°C. A significant difference was denoted for CI ($P = 0.036$), CI+CII ($P = 0.031$) and U ($P = 0.028$). For Leak and CII, a trend was discernable, but the differences were not statistically significant. For CIV, respiration rates were maintained at approximately unchanged levels. When comparing 15°C with 35°C, the only significant difference was found for CIV, where mitochondrial respiration was much higher at 35°C than at 15°C ($P = 0.03$). In *Elliptio complanata*, comparison of respiration rates (**Fig. a2B**) yielded no significant differences in all parameters. However, an observable trend was quite like the one observed in *D. bugensis* in that the values at 25°C were higher than those at 15°C, but the ones at 35°C were similar to values at 15°C except for CIV, where the respiration rate was maintained between 25°C and 35°C. Respiratory rates were also normalized per mg of tissue (**Fig. s1**) and citrate synthase activity (**Fig. s2**) and trends were pushing in the same direction (increase at 25°C compared to 15°C followed by a noted decrease at 35°C).

Our results were also expressed as flux control ratios (FCRs) in order to assess qualitative changes in mitochondria (instead of quantitative). In *D. bugensis*, comparison of FCRs (**Fig. a3A**) showed no significant changes between 15°C and 25°C in all parameters. At

35°C, for Leak, CI, CI+CII and CIV, a significant increase in the FCRs was detected compared to 25°C ($P = 0.011$, $P = 0.024$, $P = 0.001$ & $P = 0.002$, respectively) as well as when compared to 15°C ($P = 0.039$, $P = 0.028$, $P = 0.0053$ & $P = 0.0002$, respectively). For CII, FCRs remained constant across all temperatures with no significant differences. In *E. complanata*, comparison of FCRs (**Fig. a3B**) showed no significant difference across all parameters when comparing values at 25°C with those at 15°C. When comparing 35°C with 25°C, a significant difference was denoted for Leak, CI and CI+CII ($P = 0.0094$, $P = 0.00045$ & $P = 0.0113$, respectively) whereas no significant differences were found for CII & CIV, although a noticeable increase was observed for CIV. When comparing 15°C with 35°C, a significant increase was found for Leak, CI, CI+CII and CIV ($P = 0.0094$, $P = 0.00036$, $P = 0.0043$ & $P = 0.039$, respectively) whereas a significant decrease was found for CII ($P = 0.031$).

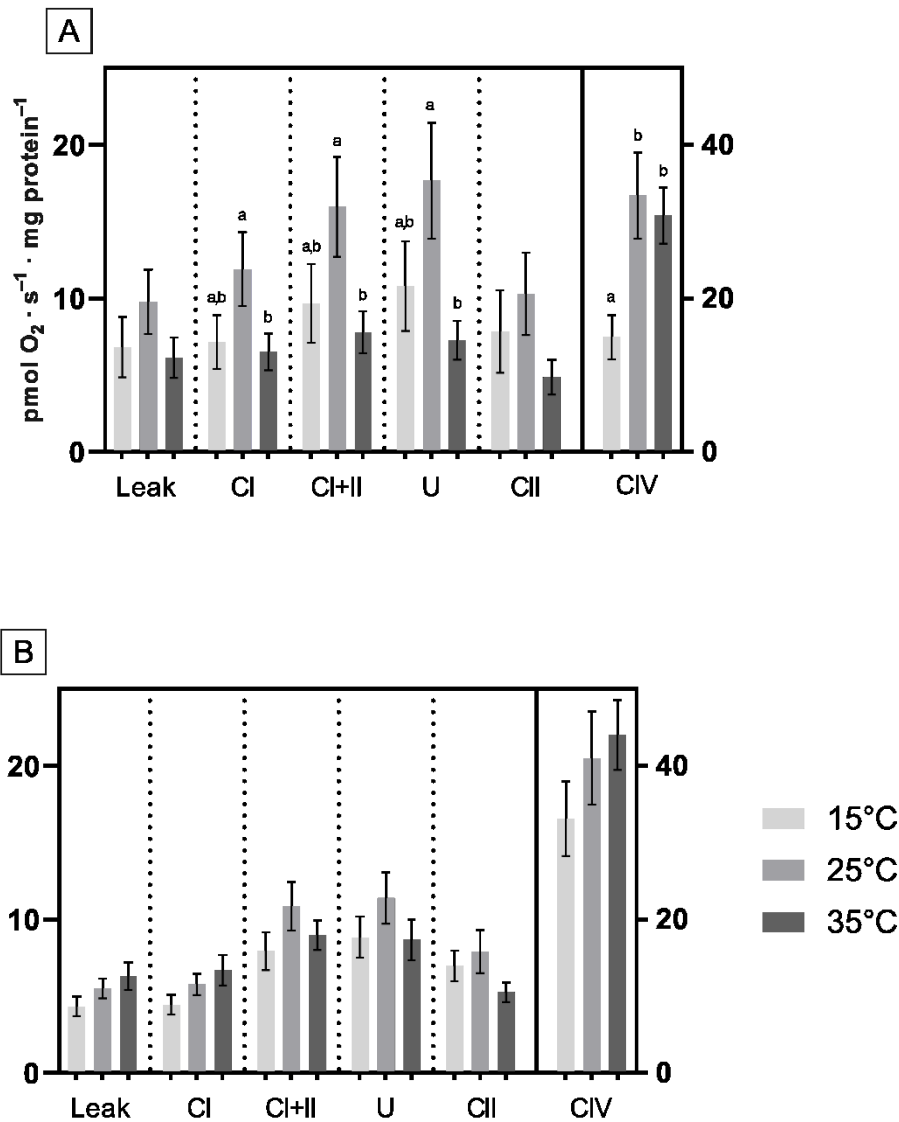


Figure 7. Figure a2. Mitochondrial respiratory capacity measured in permeabilized gills at three different temperatures in *Dreissena bugensis* (A) and *Elliptio complanata* (B).

Data, normalized for mg of proteins, are represented as means \pm SEM ($n = 9$ for *D. bugensis*, $n = 12$ for *E. complanata*). Respiratory parameters: **Leak**, presence of CI-linked substrates without ADP; **CI**, presence of CI-linked substrates with ADP; **CI+II**, presence of CI/CII-linked substrates with ADP; **U**, presence of CI/CII-linked substrates with ADP and added uncoupler (FCCP); **CII**, presence of CI/CII-linked substrates with ADP and added uncoupler (FCCP) as well as CI-linked inhibitor; **CIV**, presence of CI/CIII-linked inhibitors with Ascorbate/TMPD for sustained activity. Significance was set as $P \leq 0.05$; letters denote differences between temperatures within a parameter. All parameters are associated with the left y axis except for CIV which is associated with the right y axis.

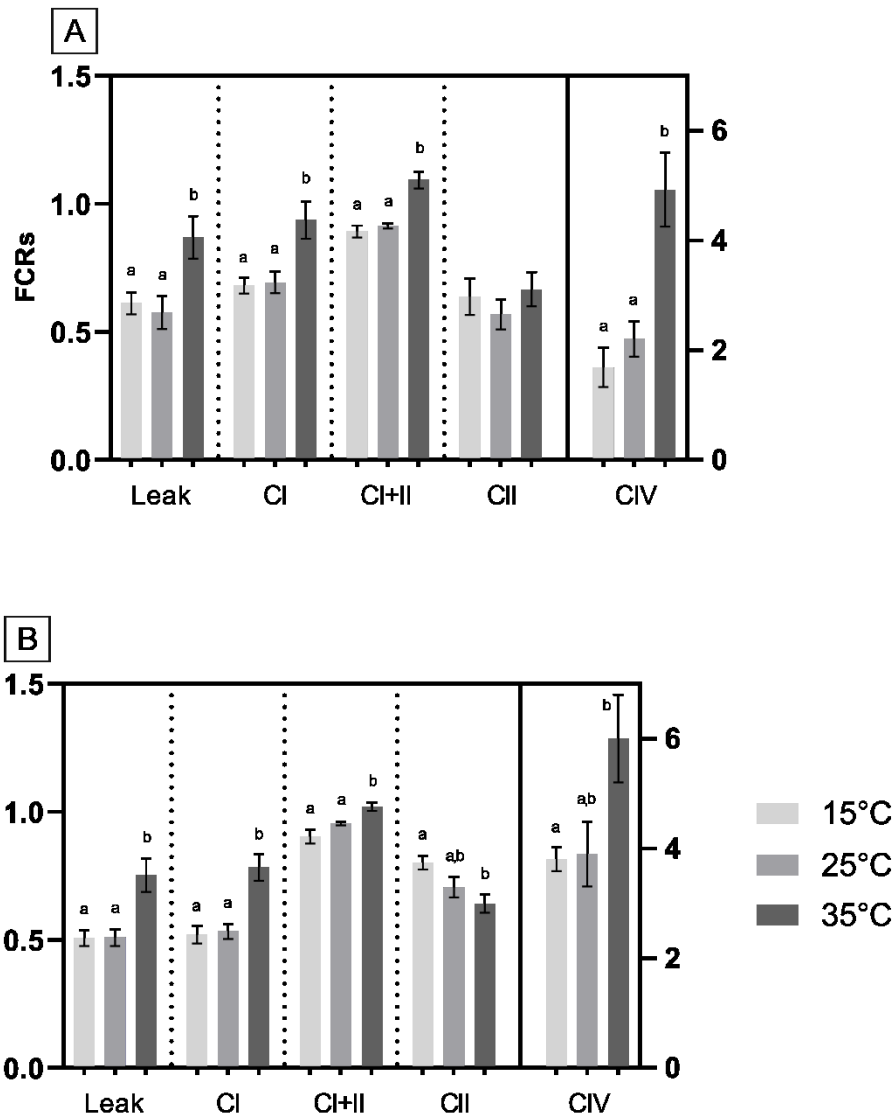


Figure 8. **Figure a3.** Flux control ratios (FCR) calculated in permeabilized gills at three different temperatures in *Dreissena bugensis* (A) and *Elliptio complanata* (B).

Data are represented as means \pm SEM ($n = 9$ for *D. bugensis*, $n = 12$ for *E. complanata*). Significance was set as $P \leq 0.05$; letters denote differences between temperatures within a parameter. All parameters are associated with the left y axis except for CIV which is associated with the right y axis.

Temperature coefficient

Results for *D. bugensis* (**Table 1A**) denotes a significant change in thermal sensitivity depending on the thermal range accounted, 15-25°C or 25-35°C. Overall, all respiratory rates experienced a decrease of Q_{10} values, passing from a positive (15-25°C) toward a negative thermal dependence (25-35°C). That was the case of the respiratory parameters CI-CII (passing from 2.33 to 0.57, $P = 0.026$), U (passing from 2.23 to 0.49; $P = 0.02$) and CIV (passing from 3.44 to 1.03; $P = 0.04$). Although not significant, a trend of decreasing Q_{10} values was also denoted for Leak (passing from 2.12 to 0.73). In *E. complanata* (**Table 1B**), a decrease in thermal sensitivity was noted from 15-25°C to 25-35°C across all parameters (with values ≥ 1) but they were not statistically significant.

Table 1A. Q_{10} values for mitochondrial respiratory capacity in *Dreissena bugensis*.
Values presented as means \pm SEM with $n = 9$.

Temperature range	Leak	CI+CII	U	CIV
15-25 °C	2.12 \pm 0.68	2.33 \pm 0.62*	2.23 \pm 0.61*	3.44 \pm 1.03*
25-35 °C	0.73 \pm 0.16	0.57 \pm 0.11*	0.49 \pm 0.11*	1.03 \pm 0.13*

Table 1B. Q_{10} values for mitochondrial respiratory capacity in *Elliptio complanata*.
Values presented as means \pm SEM with $n = 12$.

Temperature range	Leak	CI+CII	U	CIV
15-25 °C	1.55 \pm 0.23	1.69 \pm 0.30	1.61 \pm 0.29	1.74 \pm 0.42
25-35 °C	1.31 \pm 0.23	1.05 \pm 0.19	1.00 \pm 0.24	1.32 \pm 0.21

Flux control factor for cytochrome c (FCFc) and mitochondrial membrane integrity

In both species, at all three temperatures, the FCFc were all close to 0 and were not significantly different at different temperatures (**Fig. s3A**).

Complex IV apparent excess capacity

We found no statistically significant difference in apparent CIV excess capacity for *D. bugensis* and *E. complanata* between 15°C and 25°C (**Fig. a4A**). However, there was a sharp increase at 35°C, reaching up to 390% in *D. bugensis* ($P = 0.0026$) and upwards of 500% in *E. complanata*, albeit without statistical significance.

Citrate synthase activity

Comparison of CS activity (**Fig. a4B**) in both species showed no significant changes across all three temperatures, although a trend similar to the one obtained for respiratory rates was observed (an increase from 15°C to 25°C followed by a decrease at 35°C).

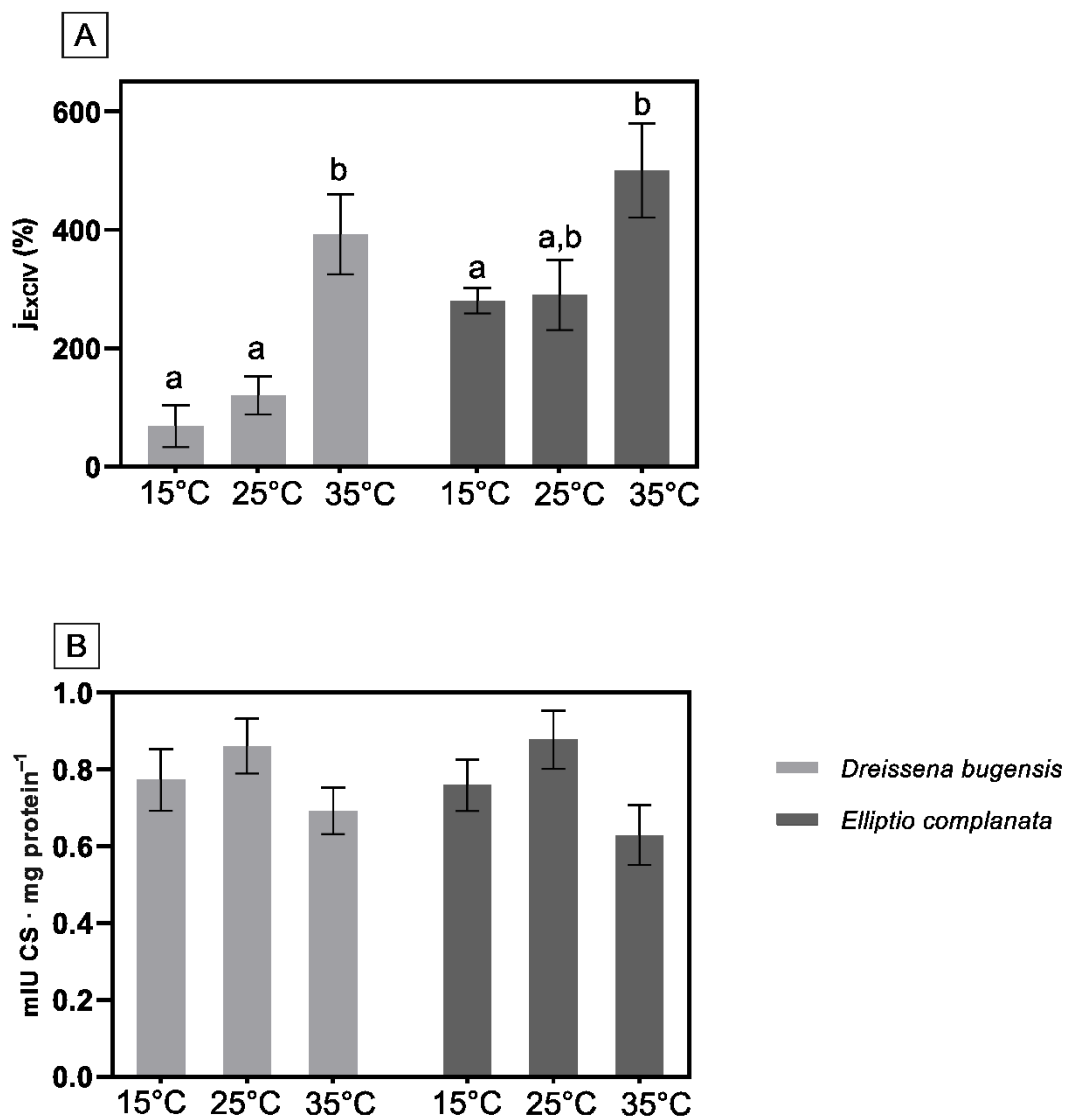


Figure 9. Figure a4. CIV apparent excess capacity (j_{ExCIV}) (A) as well as citrate synthase activity (mIU · mg proteins⁻¹) (B) in both species at the three measured temperatures.

Data are means ± SEM ($n = 9$ for *D. bugensis*, $n = 12$ for *E. complanata*). Significance was set as $P \leq 0.05$; letters denote differences between temperatures within a parameter.

Discussion

Metabolic depression at elevated temperatures

We investigated the thermal sensitivity of the mitochondrial metabolism of two freshwater bivalves, i.e. the north American endemic unionid species *Elliptio complanata* (eastern elliptio) and the invasive quagga mussel *Dreissena bugensis*, to determine whether it might play a role in the invasive success of the quagga mussel in North America. The mitochondrial capacity increased gradually in both species from 15-25°C (**Fig. a2**), temperatures that are within their survival range (Galbraith *et al.*, 2012; Choi *et al.*, 2013; Martin 2016; McMahon 1996), and this increase was also reflected by the Q_{10} values. It is generally admitted that the normal range of Q_{10} values is between 2.0 and 3.0 in aquatic ectotherms (Pisek *et al.*, 1973; Reyes *et al.*, 2008). Q_{10} values measured for OXPHOS parameters in the quagga mussel (**Table 1A**) seem to be consistent with this. For example, McMahon (1996) and Fanslow *et al.* (2001) denoted Q_{10} values ranging from 1.7 to 2.3 for temperature between 15 and 25°C for whole animal oxygen consumption rates and enzymatic ETS activity in *Dreissena polymorpha*, a closely related species of the quagga mussel. Fanslow *et al.* (2001) also reported respiration and ETS Q_{10} values for 10-20°C of 1.6 to 2.5. Our Q_{10} values (15-25°C) were of 2.12 (Leak), 2.33 (CI+CII) and 2.23 (U), which falls well into the range described above. However, Q_{10} values for CIV activity were well above at 3.44. This suggests that, in the quagga mussel, cytochrome *c* oxidase activity is the most thermally sensitive OXPHOS parameter in this temperature range, with its activity increasing much more quickly than that of other respiratory parameters. Overall our results reflected a positive thermal dependence of metabolic reactions for the measured temperatures. Since ectotherm metabolic needs are severely dependent on

ambient temperature (Clarke & Fraser, 2004), an increase in temperature (and therefore, ATP requirements) without an increase in metabolic activity would hinder an individual more than aid it. Once reaching 35°C (*i.e.* temperature extremes that may occur on an intermittent basis in shallow/turbid ditches and small creeks in both species' habitats; McMahon, 1996), a decrease in respiratory rates was observed for all parameters (except CIV) in the quagga mussel (**Fig. a2A**), whereas there was no significant effect of temperature on respiration rates among all parameters measured in the eastern elliptio (**Fig. a2B**). This is in line with a metabolic depression, a phenomenon that may become more frequent with global warming, and that has already been seen in several studies (e.g. Christen *et al.*, 2018). This is again reflected by the Q_{10} values, which indicate a switch toward a negative thermal sensitivity in *D. bugensis* (increasing temperature is associated with decreasing reaction activity, which does not sustain the increased energetic demand). Our results are incongruent with published studies that had shown that both species' critical thermal maximum (temperature at which loss of bodily equilibrium occurs) was around 39-41°C (Galbraith *et al.*, 2012; Choi *et al.*, 2013). Our results are also incongruent with the fact that the southern geographical distribution range for the exotic quagga mussels lies more to the south (in Mexican lakes) than that of the eastern elliptio (northern Florida) (Cummings & Cordeiro, 2011; Wakida-Kusonoki *et al.*, 2015). This incongruence with previous studies could be due to experimental procedures. For example, Galbraith *et al.* (2012) studied the whole organism while we concentrated on mitochondria from gill tissues. Thus, there may be factors potentiating thermo-tolerance at the organism level that we could not account for with our experimental strategy that aimed to elucidate thermo-tolerance at the mitochondrial level. In *E. complanata*, Q_{10} values hovered between 1.5 to 1.7 for 15-25°C (**Table 1B**), and although these values dipped to 1.0-1.3 at 25-35°C, the differences

were not statistically significant for all measured parameters (Leak, CI+II, U and CIV). This leads us to surmise that the eastern elliptio possesses a more thermally-independent OXPHOS than the quagga mussel, as denoted by the lack of significant differences in respiratory rates and Q_{10} values across the 25-35°C temperature range. This thermal resistance mirrored results noted in a previous study conducted by Ganser *et al.* (2015), which characterized the eastern elliptio as a very thermally tolerant species by measuring oxygen consumption at different temperatures through the use of whole animal respirometry.

Interestingly, cytochrome *c* oxidase appeared to be the only complex in both species able to maintain an elevated activity level at 35°C akin to levels at 25°C (**Fig. a2** for respirometry & **Fig. a3** for FCR). This seems to reflect a greater maintenance of CIV function when compared to other complexes. Similar results have already been observed in other aquatic ectotherms (Blier *et al.*, 2001; Oellermann *et al.*, 2012; Blier *et al.*, 2014; Kake-Guena *et al.*, 2017). Otherwise, in both species, O_2 flux of the Leak state was mirrored almost exactly by CI. This result, which is congruent with previous findings for *E. complanata* (Bettinazzi *et al.*, 2019b), suggests a relatively small input in electron flow provided by NADH dehydrogenase in these two freshwater bivalves. However, we cannot discard the possibility that in one or both species, alternate pathways play an important role in fueling the OXPHOS. Many species across the animal kingdom (e.g., hummingbirds, bats, naked mole rats, and certain flies) have been found to use alternate substrates such as proline (McDonald *et al.*, 2018). In bivalves, glycerophosphate has already been found to be important for mitochondrial functions (Bettinazzi *et al.*, 2019a), as well as fatty acid oxidation (Moyes *et al.*, 1990). As such, it is presumable that even the bivalves we tested may rely on these alternative fuels as sources of electrons. The total flux of CI+II is matched by uncoupled respiratory rates, suggesting that, in

both *E. complanata* and *D. bugensis*, there is little to no limitations of the OXPHOS on the phosphorylation system. This lack of limitation may reflect little control exerted by the phosphorylation system over OXPHOS capacity in both species (Bettinazzi *et al.*, 2019a).

Thermo-induced OXPHOS impairment

Overall, respiratory rates in both species suggest (to different extents) a negative impact of elevated temperatures on aerobic capacity and this impairment is also reflected by the flux control ratios. FCRs in both species (**Fig. a3**) did not vary in all parameters between 15°C and 25°C, suggesting that in this range, the gills preserved their original mitochondrial organization. However, at 35°C, FCRs were significantly higher for all parameters in both species except for CII, reflecting a thermally induced change of OXPHOS organization. In the quagga mussel, the CII FCR value remained unchanged (unlike the observed decrease in the eastern elliptio), which suggests that across all three measured temperatures, CII's proportional contribution to the maximal OXPHOS capacity remained constant. The general increase in FCRs at 35°C is found in both species and can be attributed to the observed sharper decrease in the maximal uncoupled respiration compared to the coupled respiration. This qualitative change could be in line with an increased membrane permeability, and this is also supported by the increase in Leak FCR (reflecting the proton leak). These findings are congruent with previous research (Pörtner *et al.*, 1999) which found an unusually elevated thermal sensitivity in proton leakage in *Laternula elliptica*, an Antarctic bivalve species, and linked it with an increase in membrane permeability. Pörtner (1999) also noted that the high thermal sensitivity of proton leakage may cause an excessive rise in mitochondrial oxygen demand and a decrease in efficiency of oxidative phosphorylation, thus potentially neutering an organism's ability to sustain itself aerobically.

The observed increase in the futile proton cycle may be associated with an increase in ROS production (Abele *et al.*, 2002), potentially as a direct consequence of damage and impairment caused by ROS (Abele *et al.*, 2002) or as a putative defense mechanism in order to lessen ROS' detrimental effects (Brand, 2000). However, whether the increase in proton leakage could be due to thermally induced damaged membranes or the results of activity of uncoupling proteins is still controversial. In fact, FCF_c values (**Fig. s3**) in both species across all three temperatures were not significantly different or elevated and as such, reflected a relatively unchanged and preserved membrane integrity. Moreover, even though uncoupling proteins are widely expressed among bivalve tissues, their putative role in stress-induced mild uncoupling is still controversial (Buttemer *et al.*, 2010) and thus, may be inadequate to induce the observable increase in proton leakage. As it remains unclear how mitochondria mediate membrane permeability and the proton cycle under thermal stress in bivalves, further experimentation is required.

Elevated temperatures also had an impact on the apparent CIV excess capacity in both species (**Fig. a4A**). This high apparent excess capacity remained stable at 15°C and 25°C, reaching around 100% for the quagga mussel and approximately 250% for the eastern elliptio. This may represent a strategy used by both species in non-lethal temperatures to mediate mitochondrial dysfunction to a certain extent, as an increased j_{EXCIV} has been shown to aid in maintaining proper mitochondrial function in face of metabolic stress (Blier *et al.*, 2013). Such apparent excess capacity has already been found in many bivalve species (Bettinazzi *et al.*, 2019a). At 35°C, the increase in CIV excess capacity compared to 25°C, reaching up to 390% in *D. bugensis* and >500% in *E. complanata*, is a product of a decreased OXPHOS activity coupled with maintenance of CIV respiratory rates at the same temperature. There is scientific

literature denoting an increased j_{EXCIV} at lower temperatures (Pichaud *et al.*, 2011; Blier *et al.*, 2014). Our results show that at the opposite end of the temperature spectrum, the same phenomenon can be present. It has been suggested that the maintenance of a high CIV excess capacity may aid in offsetting the detrimental effects of reactive oxygen species. It has also been proposed to regulate the redox state of upstream ETS complexes and aid in O₂ binding (Blier *et al.*, 2017). As such, our results could possibly reflect a compensatory process involving the lowering of ROS production as well as the facilitation of O₂ binding in hypoxic environments which are more common at high temperatures. Solely characterizing the aerobic response may not paint the whole picture. Indeed, bivalves are known to possess powerful anaerobic capabilities (Müller, 2012). Future experimentation should therefore consider measuring the anaerobic response of these species in addition to aerobic capacity.

Citrate synthase activity was assayed (**Fig. a4B**) to determine whether the highlighted metabolic depression observed in our species at 35°C could be reflected in metabolic processes upstream of OXPHOS. Our results, in both species, showed no significant difference in CS activity. These findings allowed us to surmise that CS activity is not directly responsible for temperature induced metabolic depression in the two studied freshwater mussels. However, the trend we noticed (an increase at 25°C followed by a decrease at 35°C) seemed to mirror activity levels in most OXPHOS parameters. These findings concur with previous research (Dunphy *et al.*, 2006; Doucet-Beaupré *et al.*, 2010) showing that citrate synthase did not have a bottleneck effect on aerobic metabolism in multiple ectotherm species. Despite that, previous research (Blier *et al.*, 2014) has shown that citrate synthase as well as other enzymes upstream of OXPHOS (e.g., pyruvate dehydrogenase complex or PDC) were effectively thermally sensitive in the Atlantic wolffish (*Anarhichas lupus*), showing an increased activity in response to

increased temperature exposure with no sign of depression. They also found that at low temperatures, PDC was responsible for metabolic depression in the same species. As such, while CS activity did not have a bottleneck effect on metabolic activity in our study, it is possible that other key enzymes (such as PDC) might.

Altogether, our results in both species in terms of respiratory rates, FCRs, CIV apparent excess capacity and Q_{10} values highlighted a temperature-induced metabolic depression suffered at 35°C linked with a mitochondrial impairment potentially due to the disruption of OXPHOS' complex synergies. This depression was generally more present in the quagga mussel than in the eastern elliptio.

Thermal tolerance linked with life history and reproductive strategies

Overall, our results demonstrate that the aerobic metabolism of the invasive quagga mussel is less thermo-tolerant than that of the endemic eastern elliptio, and this could be related to both species' life history traits. As argued by McMahon (1996), contrary to unionid freshwater mussels, dreissenids are relatively recent colonizers of freshwaters, and they have retained some of the primitive characteristics of their marine ancestors including planktonic larvae, and reduced resistance to environmental stress. Unionids have evolved better resistance adaptations, such as long lifespans, extensive iteroparity, low effective fecundities, large offspring, delayed maturity, and reduced growth rates, that make them better suited to survive in stable and extreme environments, but that prevent them from rapid habitat recolonization after extirpation by environmental disturbance (McMahon, 1996). By contrast, dreissenids are less competitive in stable and extreme habitats and they have evolved different life history traits such as elevated fecundity, fast growth, early maturity, and attenuated lifespans that allow them

to rapidly recolonize unstable habitats after extirpation by unpredictable environmental stressors (McMahon, 1996). Selection pressures for resistance adaptations are reduced in unpredictable habitats, and for a species like *D. bugensis*, metabolic resistance is of little use as it relies on its elevated growth and fecundity to either invade new environments or maintain prior populations (McMahon, 2002). An elevated metabolic resistance would require greater energy investments from an individual, which is much more characteristic of species like the eastern elliptio. As such, while an elevated temperature is more detrimental to the individual quagga than it is to the individual eastern elliptio, on a grander scale, elliptio populations, being long-lived and slower to reproduce, will potentially suffer more from increased thermal instability, not being able to bounce back as easily as the quagga. As suggested by McMahon (1996), adaptations to unstable habitats have allowed *D. bugensis* and its cousin *D. polymorpha* to be extremely successful invaders of North American freshwaters.

Conclusion

Our research highlights a clear effect of elevated temperatures on the mitochondrial metabolism of both studied species, i.e. at temperatures close to the upper limit, mitochondrial functions are compromised. In both species tested, the metabolic depression induced by exposure to high temperatures links with a similar reorganization (or impairment) of the OXPHOS machinery, characterized by a lower coupling and an increased futile proton cycle. Our study provides a key comparative analysis of mitochondrial OXPHOS activity in two north American freshwater bivalves and emphasizes the essential role played by mitochondria in setting thermal tolerance in aquatic ectotherms, highlighting how mitochondrial thermal

sensitivity may indeed determine the upper thermal limit and affect the survival and distribution of animal species. However, a more comprehensive study outlying thermal tolerance of the multiple components of the mitochondrial machinery (e.g. glycolysis, TCA cycle, OXPHOS, potential alternative pathways) is required in order to better understand how metabolic thermal sensitivity plays into the global equation underlying the decline, maintenance or growth of freshwater bivalves. The complex processes that make up the mitochondrial machinery render it difficult to pinpoint specific bottlenecks that may mediate thermal tolerance. Thus, a better understanding of these functions may help future conservation efforts by promoting the development of more adapted and effective predictive models.

Author's Contributions

G.H. carried out the laboratory work, data analysis, and drafted the manuscript; S. Be. participated in laboratory work and experiment design as well as manuscript revision; A. G. collected and maintained the studied organisms and reviewed the manuscript; D. B. supervised the study and reviewed the manuscript; S.Br. conceived, coordinated, and supervised the study. All authors gave final approval for publication.

Acknowledgements

This study was funded by the National Sciences and Engineering Research Council of Canada and the Groupe de Recherche Interuniversitaire en Limnologie.

Data Availability

Data has not been uploaded to a public domain and is available upon request.

Conflicts of Interest

All authors have no conflicts of interest to declare.

Cet article est soumis à la revue « Journal of Experimental Biology »

3 Discussion

L'objectif principal de ce projet de recherche était de mesurer le métabolisme mitochondrial de *Dresseina bugensis* et de *Elliptio complanata* à différentes températures dans le but de caractériser leur réponse face à l'induction d'un stress thermique. Malgré le fait que les deux espèces soient en mesure de survivre à des températures excédant 35°C (Galbraith *et al.*, 2012; Choi *et al.*, 2013; Martin, 2016), nous avons voulu déterminer si la thermo-tolérance des mitochondries de *D. bugensis* pouvait partiellement expliquer le succès invasif qu'elle connaît présentement à travers l'Amérique du Nord. Notre hypothèse était que les mitochondries de la *D. bugensis* seraient plus tolérantes à l'exposition à des températures élevées en comparaison avec celles de l'*elliptio* de l'est, une espèce native en Amérique du Nord. Nous avons testé cette hypothèse à l'aide de la respirométrie à haute résolution.

3.1 Le métabolisme mitochondrial aux trois températures testées

3.1.1 À 15°C et 25°C : Des températures considérées non stressantes

Nous avons testé les mitochondries branchiales des deux espèces à trois températures : 15°C, 25°C et 35°C. Les deux premières températures représentent des températures communément retrouvées par les deux espèces dans leur habitat (Galbraith *et al.*, 2012; Choi *et al.*, 2013; Martin 2016; McMahon 1996). Tel qu'attendu, par rapport à 15°C, nous avons observé une augmentation du métabolisme (par proxy de consommation d'oxygène) à 25°C. Pour répondre à la demande croissante en ATP, l'organisme se voit obligé d'augmenter ses

capacités mitochondriales. Cette augmentation s'est aussi observée au niveau du coefficient de température (Q_{10}) et du ratio de contrôle du flux (FCR).

Le coefficient thermique Q_{10} représente l'augmentation de vitesse d'une réaction ou d'un processus pour une augmentation de 10°C et représente donc un ratio. Un Q_{10} de 1.0 représente une indépendance thermique ($25^{\circ}\text{C}/15^{\circ}\text{C} = 1.0$, donc pas de changement au niveau de la réaction). Des ratios plus élevés que 1 représentent une dépendance positive (la vitesse de réaction augmente avec l'augmentation de la température, par exemple un Q_{10} de 2.0 indique une vitesse de réaction doublée) et des valeurs plus petites que 1 représentent une dépendance négative (la vitesse de réaction diminue avec l'augmentation de la température). Généralement, chez les ectothermes aquatiques, le Q_{10} moyen se retrouve entre 2.0 et 3.0 (Pisek, 1973). Chez *D. bugensis*, entre 15°C et 25°C , nous avons observé des valeurs de Q_{10} de 2.12 pour le « Leak State », 2.33 pour le CI+CII, 2.23 pour U et de 3.44 pour le CIV, des valeurs typiques chez les organismes ectothermes. Fanslow *et al.* (2001) avaient trouvé des valeurs similaires aux mêmes températures pour l'espèce proche parente *D. polymorpha* pour l'activité enzymatique du STE et la consommation d'oxygène au niveau de l'animal complet (1.7 à 2.3). Ce qui ressort de la norme ici est la thermo-sensibilité du CIV (cytochrome *c* oxydase ou CIV). À 3.44, le CIV est de loin le complexe le plus sensible aux fluctuations de températures. Son activité a plus que triplé entre 15°C et 25°C .

Chez *E. complanata*, les valeurs de Q_{10} étaient de 1.55 pour le « Leak State », 1.69 pour CI+CII, 1.61 pour U et de 1.74 pour le CIV. Il semble que la grande différence entre les deux espèces se retrouve dans la thermo-sensibilité du CIV, qui est deux fois plus sensible chez *D. bugensis* que chez *E. complanata*. Ceci nous mène à supposer que la moule Quagga compte en

plus grande partie sur l'activité du CIV pour subsister à ses besoins énergétiques à des températures non stressantes. Ceci pourrait représenter une divergence dans la distribution du « fardeau énergétique » entre les deux espèces. Où l'elliptio semble diviser plus équitablement le « fardeau » entre ses complexes, il semble nécessaire d'augmenter considérablement la consommation d'oxygène du CIV chez la Quagga pour suivre le pas.

3.1.2 À 35°C : la dépression métabolique

À 35°C, les valeurs de consommation d'oxygène ont chuté à des niveaux similaires ou plus bas que 15°C chez *D. bugensis* excepté pour le CIV qui a pu maintenir (et non augmenter) son activité. Ceci se reflète aussi par les valeurs de Q_{10} de 0.73, 0.57, 0.49 et 1.03 respectivement pour le « Leak State », CI+II, U et CIV. On remarque donc une dépendance négative entre l'activité du STE et la température entre 25°C et 35°C. Ceci est plutôt surprenant, puisque Choi *et al.* (2013) avaient dénoté un taux de survie de plusieurs heures à des températures avoisinant 39°C chez *D. bugensis*.

Quoique moins remarquable que chez *D. bugensis*, nous avons également observé une dépression métabolique chez *E. complanata* à 35°C, au niveau du CI, CI+II, CII ainsi que U. Le « Leak State » et le CIV ont maintenu un niveau d'activité similaire à celui observé à 25°C. Au niveau du coefficient Q_{10} , nous avons rapporté des valeurs de 1.31, 1.05, 1.00 et de 1.32 pour le « Leak », le CI+II, U et le CIV, respectivement. Ces valeurs n'étaient pas significativement différentes des valeurs de 15-25°C. Ceci veut dire qu'entre 25°C et 35°C, *E. complanata* semble démontrer une indépendance thermique (les valeurs de consommation d'oxygène ne changent pas significativement). Donc, en comparaison avec la moule Quagga, l'elliptio semble mieux tolérer une exposition à 35°C. Effectivement, les valeurs de la moule Quagga tant au niveau des

changements de la consommation d'oxygène qu'au niveau du coefficient thermique Q_{10} ont reflété une dépression métabolique beaucoup plus aigüe. Nos résultats pour *E. complanata* sont en accord avec une étude antérieure (Ganser *et al.*, 2015) qui avait qualifié l'espèce de très thermo-tolérante.

En résumé, nos résultats ont démontré une dépression métabolique (quoiqu'à des degrés différents) à haute température chez *D. bugensis* et *E. complanata*. Ceci se reflète au niveau de la consommation d'oxygène et des valeurs de Q_{10} , mais pas au niveau du cycle TCA (voir section 3.1.3).

3.1.3 La citrate synthase et le cycle TCA

Dans le but de cibler un effet « bottleneck » potentiel qui précédait le STE, nous avons décidé de tester l'activité enzymatique d'une enzyme du cycle de l'acide tricarboxylique (TCA). Le terme « bottleneck », dans ce contexte, désigne une enzyme, une protéine ou un mécanisme dans la machinerie métabolique où se retrouveraient les débuts d'un échec métabolique (ce qui pourrait enclencher un effet papillon, et donc expliquer les résultats discutés dans les sections précédentes). Nous avons choisi de mesurer la citrate synthase (CS), une enzyme du cycle TCA (Gnaigner, 2014). La CS catalyse la condensation de l'acétyl-CoA et l'oxaloacétate pour former le citrate. Étant une enzyme de la matrice mitochondriale, elle constitue un bon marqueur de l'activité aérobie (Robb *et al.*, 2008). Chez les deux espèces, nous avons retrouvé le même patron, c'est-à-dire une augmentation très légère entre 15°C et 25°C suivi d'une baisse légère entre 25°C et 35°C. Bien que les variations n'étaient pas significatives dans les deux espèces, le patron observé semble suivre celui de la consommation d'oxygène (augmentation à 25°C suivi d'une chute à 35°C) ce qui corrobore les résultats présentés plus haut.

La CS n'est qu'une des multiples enzymes qui composent le cycle TCA. Si nous n'avons pas remarqué de différence dans l'activité, ceci ne veut pas dire qu'il n'est pas possible de retrouver un « bottleneck » dans l'activité d'une autre enzyme (soit du TCA, soit d'un autre endroit dans la machinerie métabolique en amont du STE). Blier *et al.* (2014) ont démontré que chez le poisson *Anarhichas lupus*, plusieurs enzymes (par exemple la pyruvate deshydrogénase) étaient thermo-sensibles à basse température. Leur activité constituait un effet « bottleneck ». Il se peut très bien alors que certaines enzymes puissent réguler le métabolisme à haute température. Si cela s'avère le cas, la dépression métabolique que nous avons observée serait potentiellement liée à une chute d'un processus en amont de l'OXPPOS. Vu que le métabolisme aérobie est très complexe et constitué de multiples « rouages », il n'est pas facile de déterminer les causes d'une dépression. Ainsi, d'autres expérimentations seront nécessaires afin de répondre à cette question.

3.2 Réorganisation mitochondriale face à un stress thermique

Nous avons déterminé les ratios de contrôle de flux (FCR) chez les espèces étudiées, car ils nous renseignent non pas sur des changements quantitatifs tels que la consommation d'oxygène, mais plutôt sur des changements qualitatifs au niveau mitochondrial (voir section suivante).

3.2.1 Les changement dans les FCR

Un changement au niveau des FCR est potentiellement indicatif d'une réorganisation mitochondriale. Si les FCR changent face à une exposition à des températures élevées, cela veut dire que les mitochondries subissent ainsi une réorganisation induite par le stress thermique.

Ceci peut se manifester de plusieurs façons (voir sections 3.2.2 et 3.2.3). En général, une augmentation du FCR d'une certaine variable (par exemple, le CI) représente une augmentation de la contribution proportionnelle de la variable à l'activité totale de l'O₂PHOS. Ceci est contrasté avec les variations quantitatives, car il est bien possible que l'activité du CI diminue, mais que son FCR augmente. En effet, le FCR est normalisé par rapport à la variable U. En général, il est important de normaliser avec une activité maximale ou un point élevé (Kake-Guena *et al.*, 2017). Vu que U représente l'activité maximale découplée du STE, il s'agit donc d'une valeur de normalisation valide. Chez *D. bugensis* et *E. complanata*, nous n'avons observé aucune augmentation du FCR au niveau de toutes les variables mesurées en comparant 25°C avec 15°C. Ceci indique qu'à ces températures, les mitochondries des deux espèces semblent préserver leur organisation mitochondriale originale (Bettinazzi *et al.*, 2019a). L'activité du CI semble copier exactement celle du « Leak » chez les deux espèces (autant au niveau de la respirométrie qu'au niveau du FCR). Nous pouvons alors supposer que la consommation d'oxygène mesurée au niveau du CI représente l'activité du « Leak », car nous n'avons pas détecté d'augmentation avec l'ajout de l'ADP. Ceci a été noté chez *E. complanata* ainsi que chez d'autres bivalves dans une étude antérieure (Bettinazzi *et al.*, 2019b).

En contraste avec 25°C, nous avons remarqué une augmentation drastique du FCR dans les deux espèces à 35°C, ce qui indique que les mitochondries ont subi une réorganisation induite par l'exposition à des températures stressantes. Cette réorganisation peut représenter plusieurs changements potentiels tels que des changements au niveau de la perméabilité membranaire (voir section 3.2.3) ou une déficience potentielle d'un ou de plusieurs complexes. Un changement du FCR peut aussi tout simplement être le résultat d'un changement au niveau de

la valeur normalisatrice (U dans notre cas). Bref, l'augmentation du FCR à 35°C peut avoir de multiples causes. Dans les 3.2.2 et 3.2.3, nous explorons certaines possibilités.

3.2.2 L'activité de la cytochrome *c* oxydase

Parmi tous les complexes étudiés en respirométrie à haute résolution dans les deux espèces, le complexe IV était le seul qui réussissait à maintenir ou augmenter son niveau d'activité à 35°C par rapport à 25°C. Tous les autres complexes mesurés (CI, CI+CII, U et CII) démontraient une dépression à 35°C en comparaison avec 25°C. La fonction primaire du CIV est de lier l'oxygène, qui est l'accepteur final des électrons du STE, pour permettre le passage de protons à travers la membrane. Sa fonction primaire mise à part, des études antérieures lui ont attribué une gamme de fonctions secondaires très importantes. Une activité élevée du complexe IV a été attribuée au maintien du bon fonctionnement mitochondrial face à un stress thermique (voir prochain paragraphe) (Blier *et al.*, 2017).

Nous avons aussi calculé l'activité en excès du CIV (« CIV apparent excess capacity » en anglais). Ceci représente l'excès de l'activité du CIV mesurée au-dessus de la limite établie par le STE (U). À 35°C, l'excès de l'activité du CIV atteignait jusqu'à 390% pour *D. bugensis* et au-delà de 500% pour *E. complanata*. Cet excès de l'activité du CIV a été associé à une meilleure capacité à diminuer les effets nocifs des dérivés réactifs de l'oxygène (DRO) et à augmenter l'affinité de la mitochondrie pour l'oxygène dans un environnement hypoxique (plus commun à des températures élevées, car la solubilité de l'oxygène dans l'eau diminue avec une augmentation de la température de l'eau) (Blier *et al.*, 2017). Un excès de l'activité du CIV a aussi été proposé comme moyen de réguler l'état réduit des complexes du STE en amont du CIV (Blier *et al.*, 2017). Cependant, il est à noter que, dans notre étude, les complexes en amont

étaient inhibés par la roténone et l'antimycine A et que le CIV était alimenté par l'auto-oxydation de l'ascorbate avec le TMPD. L'activité mesurée représente donc l'activité maximale potentielle du CIV et non son activité alimentée par le STE. Avec l'Oroboros, il est impossible de mesurer l'activité du CIV soutenue par le STE sans introduire un biais causé par les limites potentielles du STE.

Autant chez la moule *Quagga* que chez l'*elliptio* de l'est, nous avons trouvé que le CIV est le complexe le plus thermo-tolérant du système OXPHOS. Ceci représente donc une caractéristique du métabolisme mitochondrial qui est commune aux deux espèces et qui n'est pas nécessairement un trait attribuable à l'espèce invasive, même si des études antérieures ont déjà associé la thermo-tolérance mitochondriale avec le succès invasif chez des ectothermes aquatiques (Iftikar *et al.*, 2010; Lockwood *et al.*, 2010; Lockwood *et al.*, 2011). Donc, chez les deux espèces, la thermo-tolérance du CIV pourrait potentiellement représenter un moyen par lequel la mitochondrie réussit à minimiser les effets nocifs induits par une exposition à un stress thermique. Vu que des études antérieures ont établi les limites thermales de ces deux espèces à environ 38-40°C (Choi *et al.*, 2013; Galbraith *et al.*, 2012), et que nos données confirment une dépression métabolique déjà présente à 35°C, il se peut bien que le CIV soit partiellement responsable de la capacité démontrée de ces deux espèces à tolérer des températures très élevées même lorsque la plupart des fonctions de l'OXPHOS semblent être affaiblies.

3.2.3 Le « Leak State » à haute température et les protéines découplantes chez les bivalves

Le « leak state » ou état de fuite, dans notre étude (et en général), représente la fuite de protons à travers la membrane mitochondriale. Dans notre cas, nous avons pu le mesurer par

proxy de la consommation d'oxygène en présence des substrats du Complexe I (pyruvate, malate et glutamate) et en absence de l'ADP. Vu que l'ADP est absolument nécessaire pour la production d'ATP, toute activité mesurée en son absence peut être attribuée à l'état de fuite. Une étude antérieure (Pörtner *et al.*, 1999) a établi un lien intime entre la température, l'état de fuite et la perméabilité membranaire des mitochondries du bivalve de l'Antarctique *Laternula elliptica*. Spécifiquement, il avait été remarqué chez cette espèce que lorsque la température environnante augmentait, l'état de fuite augmentait en parallèle (Pörtner *et al.*, 1999). Ceci était une découverte importante, car l'état de fuite peut représenter une consommation non négligeable d'oxygène. Une telle situation engendrerait donc une baisse de l'efficacité de l'OXPPOS, vu que moins d'oxygène serait acheminé dans le but de produire de l'ATP. Ainsi, Pörtner *et al.* (1999) avaient émis l'hypothèse que l'augmentation de l'état de fuite pouvait être responsable (en partie ou en totalité) de l'augmentation des besoins en oxygène face à une exposition à des températures élevées chez les bivalves. Les auteurs avaient également associé cette augmentation à une augmentation de la perméabilité membranaire de la mitochondrie. Cependant, ils n'avaient pas déterminé la raison pour laquelle la perméabilité membranaire était positivement corrélée avec la température ambiante. Nous avons aussi remarqué une corrélation positive entre la température et l'état de fuite, mais nos données ne nous permettent pas d'émettre une explication certaine. Cependant, nous pouvons spéculer grâce aux connaissances acquises depuis l'étude de Pörtner et ses collègues qui date de 20 ans. Premièrement, nous pouvons écarter l'idée que l'augmentation du « Leak State » serait lié à une augmentation des dommages membranaires, car lorsque nous avons vérifié l'intégrité membranaire mitochondriale à l'aide d'un ajout de cytochrome *c*, celle-ci était bien préservée à toutes les températures testées chez les deux espèces et ne variait pas de façon statistiquement

significative. Par contre, l'intégrité fut seulement mesurée pour la membrane externe (impossible pour l'interne avec notre protocole). Il faut alors considérer la possibilité des dommages causés envers la membrane interne. Deuxièmement, nous avons supposé que l'augmentation de l'état de fuite pourrait potentiellement être attribuée à l'activité de protéines découplantes qui augmenteraient la perméabilité membranaire. Une protéine découplante est une protéine qui « dissocie » le STE de l'ATP synthase de manière à stimuler une plus grande consommation d'oxygène sans nécessairement augmenter la production d'ATP (voir Figure 10).

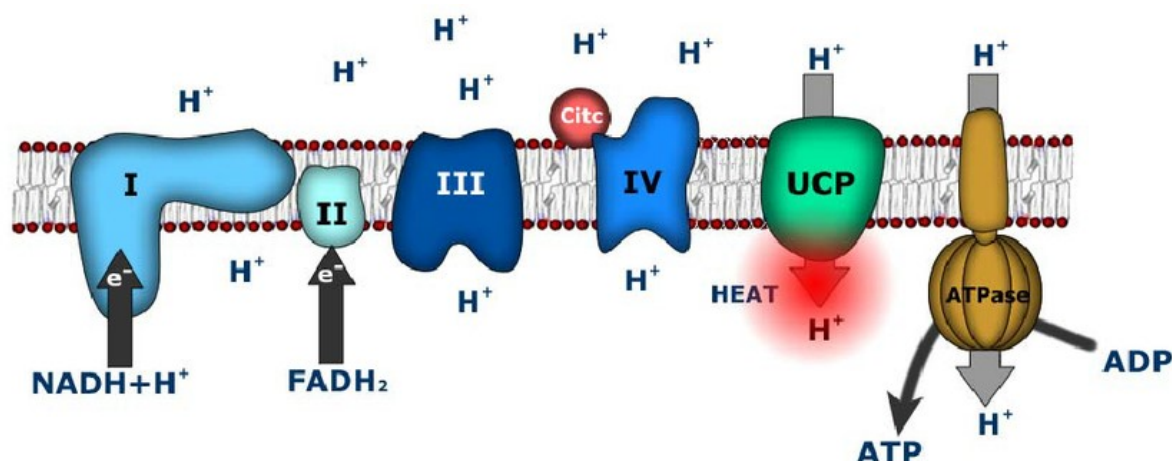


Figure 10. Activité de protéines découplantes (UCP). Figure tirée de Valle *et al.*(2010)

Chez les mammifères, ces protéines sont souvent présentes en grandes quantités dans les cellules de gras brun et servent à stimuler une augmentation de l'activité du STE découplée dans le but de produire de la chaleur (Townsend & Tseng, 2012). Chez les bivalves, ceci n'est pas le cas, car ce sont des ectothermes (Buckley *et al.*, 2012). L'utilité des protéines découplantes chez les bivalves est encore un sujet controversé et ne fait pas l'unanimité dans la littérature scientifique. En effet, une exposition au stress thermique chez l'huître *Crassostrea gigas* n'a pas

réussi à induire l'activité de la protéine découplante UCP5 (Buttemer *et al.*, 2010). En revanche, cette étude n'a considéré qu'une protéine découplante, UCP5, parmi une multitude. Il est donc possible que chez les deux espèces à l'étude ici, l'augmentation de la perméabilité membranaire face à un stress thermique soit liée à l'activité d'une ou de plusieurs autres protéines découplantes, mais ceci reste à confirmer. Il est important à mentionner que la présence de ces protéines doit aussi être confirmées dans les branchies, car elles sont normalement présentes dans d'autres systèmes/organes. Fait intéressant, Buttener *et al.* (2010) avaient attribué un autre rôle aux protéines découplantes. Ils ont proposé que le découplage mitochondrial est une manière potentielle de faire baisser la concentration d'oxygène lorsque l'animal se retrouve dans un environnement sursaturé en oxygène. Chez le polychète marin *Nereis diversicolor* ainsi que chez la palourde *Arctica islandica*, lorsque la concentration d'oxygène (PO_2) arrivait à sursaturation, les mitochondries étaient de plus en plus découplées et utilisaient moins d'oxygène pour produire de l'ATP (Buttener *et al.*, 2010). Ainsi la régulation du niveau d'oxygène pourrait être une fonction potentielle des protéines découplantes chez les bivalves.

D'un autre côté, Brand (2000) avait émis l'hypothèse que l'augmentation de l'état de fuite pourrait potentiellement être liée aux dérivés réactifs de l'oxygène (DRO). Spécifiquement, son hypothèse suggérait que l'augmentation de l'état de fuite était en réponse à une surproduction des DRO et servait à réduire leurs effets néfastes en modulant à la baisse leur production. Si nous attribuons l'augmentation de l'activité de fuite aux protéines découplantes, il serait donc possible que ces protéines puissent agir dans le but de protéger la machinerie cellulaire contre les DRO.

3.3 La thermo-tolérance et la production de dérivés réactifs d'oxygène

Les dérivés réactifs de l'oxygène tels que les radicaux libres, les ions oxygénés et les peroxydes sont omniprésents dans les cellules chez les eucaryotes aérobies. Les DRO sont au centre d'un paradoxe auquel font face les organismes complexes. L'oxygène est nécessaire pour plusieurs réactions essentielles dans une cellule (dont la production d'ATP). Cependant, l'oxygène est extrêmement réactif et peut endommager l'organisme par l'entremise de la production de DRO. Généralement vu comme nocifs à hautes doses, ils ont néanmoins d'importants rôles à jouer lorsque présents en plus petite quantité. Ils agissent comme seconds messagers dans plusieurs réactions (par exemple, durant l'induction de l'apoptose) et ils sont également impliqués dans la réponse immunitaire (Bast *et al.*, 1991).

Une étude récente (Christen *et al.*, 2018) a décrit une augmentation de la production de DRO en lien avec un échec du système OXPHOS suite à une exposition à de hautes températures chez le poisson *Salvelinus alpinus*. L'étude a mis en valeur l'importance non seulement des mitochondries dans l'établissement de la tolérance thermique chez les ectothermes, elle a aussi identifié un facteur pouvant partiellement expliquer la dépression métabolique observée à des températures élevées. En effet, il est connu que les DRO peuvent endommager les protéines (Brooker, 2011). Ainsi, une protéine endommagée ne peut fonctionner à son plein potentiel. Vu que le système OXPHOS est composé de multiples protéines, il est alors possible que l'augmentation de la production de DRO puisse jouer un rôle important dans la tolérance thermique. Nous n'avons pas mesuré la production directe de DRO, mais nous pouvons établir des parallèles entre notre étude et Christen *et al.* (2018). Par exemple, il est connu qu'une augmentation de la production de DRO chez les ectothermes est intimement liée à une

augmentation de la contribution proportionnelle de l'état de fuite à l'activité totale de l'OXPPOS dans la mitochondrie (Abele *et al.*, 2002; Christen *et al.*, 2018). Lors de notre étude, nous avons constaté qu'à 35°C, au niveau des FCR, la contribution du « Leak State » à la totalité de l'OXPPOS était significativement plus grande chez les moules Quagga et elliptio. Il est donc probable que la production de DRO soit elle aussi augmentée par rapport au niveau homéostasique. Si cela s'avère le cas, nous pouvons émettre l'hypothèse que chez la moule Quagga et l'elliptio de l'est, les DRO limitent la tolérance thermique.

Conclusion et perspectives futures

L'ensemble de nos données concernant le métabolisme aérobie de l'elliptio de l'est ainsi que de la moule Quagga démontre que chez les deux espèces, une dépression mitochondriale s'enchaîne face à une exposition à des températures stressantes et élevées, et que cette dépression s'observe de façon plus remarquable chez la moule Quagga. Dans les deux cas, la dépression mitochondriale est corrélée à une réorganisation de la machinerie de l'OXPPOS (reflétée par une augmentation générale des FCR) ainsi qu'une baisse des valeurs de Q_{10} . Notre recherche donne un autre exemple clair de la manière dont les mitochondries pourraient jouer un rôle dans l'établissement de la tolérance thermique chez les ectothermes aquatiques, plus particulièrement chez les moules d'eau douce. Cependant, d'autres études seront nécessaires afin de démontrer clairement qu'une thermo-tolérance mitochondriale élevée pourrait être en lien avec le succès invasif de certaines espèces de moules. Malgré cela, nous pouvons établir certains liens entre nos observations et les traits de vie (life history traits) des deux espèces à l'étude. La thermo-résistance mitochondriale implique un investissement énergétique élevé, quelque chose qui n'est pas commun chez des colonisateurs récents comme la moule Quagga

en Amérique du Nord (McMahon, 1996). Les Quaggas comptent potentiellement sur leur cycle de vie rapide ainsi que leur taux de reproduction et de fécondité élevés pour maintenir des niveaux de populations en santé ou pour coloniser (envahir) de nouveaux environnements (McMahon, 1996). Cette stratégie est récompensée dans des environnements instables et imprévisibles. De son côté, l'elliptio de l'est, étant présente depuis bien plus longtemps que la moule Quagga en Amérique du Nord, semble adopter une stratégie caractérisée par un investissement énergétique plus élevé dans l'individu (et donc, dans la thermo-résistance), avec des taux de reproduction et de fécondité moins importants mais une longévité accrue. Cette stratégie est favorable aux espèces adaptées à un environnement plus stable et prévisible.

McMahon (2002) a donc émis l'hypothèse que le succès des envahisseurs tels que la moule Quagga n'est pas dû à leur tolérance aux stress thermiques, mais à leur stratégie de reproduction. Ils atteignent la maturité sexuelle rapidement, possèdent une durée de vie courte et ont un taux de fécondité très élevé. Ils utilisent donc ces traits de vie pour maintenir des taux de populations élevés lorsqu'ils font face à des environnements qu'on peut considérer extrêmes (McMahon, 2002). Au contraire, chez *E. complanata*, les individus ont un taux de fécondité plus bas, une durée de vie plus longue ainsi qu'une croissance/maturité sexuelle plus longue et lente. Ces caractéristiques devraient être accompagnées par une résistance plus élevée au stress thermique et nos données semblent corroborer cette hypothèse (McMahon, 2002).

Il se peut aussi que la croissance de certaines moules d'eau douce soit limitée par le fait qu'elles requièrent un poisson hôte pour un des stades de leur cycle de vie. En effet, la larve glochidie de l'elliptio nécessite un hôte pour se métamorphoser. Mais l'elliptio est généraliste et peut parasiter près d'une dizaine d'espèces de poissons différentes, dont la perche jaune (*Perca flavescens*) et sept centrarchidés différents (Lellis *et al.*, 2013). Donc, même avec un

déclin de population d'un poisson hôte, elle devrait pouvoir s'adapter et changer de poisson hôte. Cependant, si un environnement se veut stressant pour tous ses hôtes, la croissance des populations d'*E. complanata* serait évidemment limitée. D'autres moules plus spécialistes pourraient être beaucoup plus susceptibles aux stress environnementaux, car elles ne possèdent que peu d'hôtes. Une étude approfondie de l'état des populations de ses hôtes pourrait élucider l'influence potentielle des changements climatiques sur le cycle de maturation de l'elliptio.

Finalement, dans notre étude, nous n'avons tenu compte que du métabolisme aérobie des deux espèces. Muller *et al.* (2012) ont démontré que les bivalves possèdent généralement un métabolisme anaérobie très efficace. Il se peut donc très bien qu'une ou les deux espèces étudiées soient dépendantes de leur métabolisme anaérobie pour faire face au stress thermique. Bien que la Quagga aie démontré une chute de son métabolisme aérobie lorsqu'exposée à des températures élevées, il est possible qu'une transition vers l'anaérobie puisse expliquer sa capacité à résister à ces températures. Pour peindre une image plus globale, des études futures devraient aussi tenir compte du métabolisme anaérobie.

Bibliographie

Abele, D., Heise, K., Pörtner, H. O., & Puntarulo, S. (2002). Temperature-dependence of mitochondrial function and production of reactive oxygen species in the intertidal mud clam *Mya arenaria*. *Journal of Experimental Biology*, 205(13), 1831-1841.

Angilletta Jr, M. J., Niewiarowski, P. H., & Navas, C. A. (2002). The evolution of thermal physiology in ectotherms. *Journal of Thermal Biology*, 27(4), 249-268.

Anthony, J. L., Kesler, D. H., Downing, W. L., & Downing, J. A. (2001). Length-specific growth rates in freshwater mussels (Bivalvia: Unionidae): extreme longevity or generalized growth cessation? *Freshwater Biology*, 46(10), 1349-1359.

Bast, A., Haenen, G. R., & Doelman, C. J. (1991). Oxidants and antioxidants: state of the art. *The American Journal of Medicine*, 91(3), S2-S13.

Bates, A.E., McKelvie, C.M., Sorte, C.J.B., Morley, S.A., Jones, N.A.R., Mondon, J. A., Bird, T.J., Quinn, G. (2013). Geographical range, heat tolerance and invasion success in aquatic species. *Proceedings of the Royal Society B*, 280, 20131958.

Bettinazzi, S., Rodríguez, E., Milani, L., Blier, P. U., & Breton, S. (2019a). Metabolic remodelling associated with mtDNA: insights into the adaptive value of doubly uniparental inheritance of mitochondria. *Proceedings of the Royal Society B*, 286(1896), 20182708.

Bettinazzi, S., Gendron, A. D., & Breton, S. (2019b). The effect of cryopreservation on mitochondrial function in freshwater mussel tissue samples (Bivalvia: Unionida). *Cryobiology*, 88,106-109.

Bitá, C. E., & Gerats, T. (2013). Plant tolerance to high temperature in a changing environment: scientific fundamentals and production of heat stress-tolerant crops. *Frontiers in Plant Science*, 4.

Blier, P. U., & Lemieux, H. (2001). The impact of the thermal sensitivity of cytochrome c oxidase on the respiration rate of Arctic charr red muscle mitochondria. *Journal of Comparative Physiology B*, 171(3), 247-253002E

Blier, P. U., Lemieux, H., & Pichaud, N. (2014). Holding our breath in our modern world: will mitochondria keep the pace with climate changes? *Canadian Journal of Zoology*, 92(7), 591-601.

Blier, P. U., Abele, D., Munro, D., Degletagne, C., Rodriguez, E., & Hagen, T. (2017). What modulates animal longevity? Fast and slow aging in bivalves as a model for the study of lifespan. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 70, pp. 130-140). Academic Press.

Bossenbroek, J. M., Johnson, L. E., Peters, B., & Lodge, D. M. (2007). Forecasting the expansion of zebra mussels in the United States. *Conservation Biology*, 21(3), 800-810.

Boyles, J. G., Seebacher, F., Smit, B., & McKechnie, A. E. (2011). Adaptive thermoregulation in endotherms may alter responses to climate change. *Integrative and Comparative Biology*, 51(5), 676-690.

Brand, M. D. (2000). Uncoupling to survive? The role of mitochondrial inefficiency in ageing. *Experimental Gerontology*, 35(6-7), 811-820.

Brijs, J., Jutfelt, F., Clark, T. D., Gräns, A., Ekström, A., & Sandblom, E. (2015). Experimental manipulations of tissue oxygen supply do not affect warming tolerance of European perch. *Journal of Experimental Biology*, 218(15), 2448-2454.

Bringolf, R. B., Cope, W. G., Eads, C. B., Lazaro, P. R., Barnhart, M. C., & Shea, D. (2007). Acute and chronic toxicity of technical-grade pesticides to glochidia and juveniles of freshwater mussels (unionidae). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26(10), 2086-2093.

Brooker RJ (2011). *Genetics: analysis and principles* (4th ed.). McGraw-Hill Science.

Buckley, L. B., Hurlbert, A. H., & Jetz, W. (2012). Broad-scale ecological implications of ectothermy and endothermy in changing environments. *Global Ecology and Biogeography*, 21(9), 873-885.

Buisson, L., Blanc, L., & Grenouillet, G. (2008a). Modelling stream fish species distribution in a river network: the relative effects of temperature versus physical factors. *Ecology of Freshwater Fish*, 17(2), 244-257.

Buisson, L., Thuiller, W., Lek, S., Lim, P. U. Y., & Grenouillet, G. (2008b). Climate change hastens the turnover of stream fish assemblages. *Global Change Biology*, 14(10), 2232-2248.

Bush, E., & Lemmen, D. S. (Eds.). (2019). *Canada's Changing Climate Report*. Government of Canada = Gouvernement du Canada.

Buttemer, W. A., Abele, D., & Costantini, D. (2010). From bivalves to birds: oxidative stress and longevity. *Functional Ecology*, 24(5), 971-983.

Choi, W. J., Gerstenberger, S., McMahon, R. F., & Wong, W. H. (2013). Estimating survival rates of quagga mussel (*Dreissena rostriformis bugensis*) veliger larvae under summer and autumn temperature regimes in residual water of trailered watercraft at Lake Mead, USA. *Management of Biological Invasions*, 4(1), 61-69.

Christen, F., Desrosiers, V., Dupont-Cyr, B. A., Vandenberg, G. W., Le François, N. R., Tardif, J. C., Dufresne, F., Lamarre, S. G. & Blier, P. U. (2018). Thermal tolerance and thermal sensitivity of heart mitochondria: Mitochondrial integrity and ROS production. *Free Radical Biology and Medicine*, 116, 11-18.

Clarke, A. (2003). Costs and consequences of evolutionary temperature adaptation. *Trends in Ecology & Evolution*, 18(11), 573-581.

Clarke, A., & Fraser, K. P. P. (2004). Why does metabolism scale with temperature? *Functional Ecology*, 18(2), 243-251.

Cummings, K. & Cordeiro, J. 2011. *Elliptio complanata*. *The IUCN Red List of Threatened Species* <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2011-2.RLTS.T188880A8656796.en>.

Dahlhoff, E. A., & Somero, G. N. (1993). Effects of temperature on mitochondria from abalone (genus *Haliotis*): adaptive plasticity and its limits. *Journal of Experimental Biology*, 185(1), 151-168.

Doucet-Beaupré, H., Dube, C., Breton, S., Pörtner, H. O., & Blier, P. U. (2010). Thermal sensitivity of metabolic enzymes in subarctic and temperate freshwater mussels (Bivalvia: Unionoida). *Journal of Thermal Biology*, 35(1), 11-20.

Dunphy, B. J., Wells, R. M., & Jeffs, A. G. (2006). Oxygen consumption and enzyme activity of the subtidal flat oyster (*Ostrea chilensis*) and intertidal Pacific oyster (*Crassostrea gigas*): responses to temperature and starvation. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 40(1), 149-158.

Fanslow, D. L., Nalepa, T. F., & Johengen, T. H. (2001). Seasonal changes in the respiratory electron transport system (ETS) and respiration of the zebra mussel, *Dreissena polymorpha* in Saginaw Bay, Lake Huron. *Hydrobiologia*, 448(1-3), 61-70.

Galbraith, H. S., Blakeslee, C. J., & Lellis, W. A. (2012). Recent thermal history influences thermal tolerance in freshwater mussel species (Bivalvia: Unionoida). *Freshwater Science*, 31(1), 83-92.

Gallardo, B., & Aldridge, D. C. (2013). Evaluating the combined threat of climate change and biological invasions on endangered species. *Biological Conservation*, 160, 225-233.

Ganser, A. M., Newton, T. J., & Haro, R. J. (2015). Effects of elevated water temperature on physiological responses in adult freshwater mussels. *Freshwater Biology*, 60(8), 1705-1716.

Gillooly, J. F., Brown, J. H., West, G. B., Savage, V. M., & Charnov, E. L. (2001). Effects of size and temperature on metabolic rate. *Science*, 293(5538), 2248-2251.

Gnaiger, E. (2014) Mitochondrial pathways and respiratory control. An introduction to OXPHOS analysis. *Mitochondr physiol network* 19.12, p. 80. Innsbruck, Austria: OROBOROS MiPNet Publications.

Graf, D. L., & Cummings, K. S. (2007). Review of the systematics and global diversity of freshwater mussel species (Bivalvia: Unionoida). *Journal of Molluscan Studies*, 73(4), 291-314.

Guderley, H., & St-Pierre, J. (2002). Going with the flow or life in the fast lane: contrasting mitochondrial responses to thermal change. *Journal of Experimental Biology*, 205(15), 2237-2249.

Hastie, L. C., Cosgrove, P. J., Ellis, N., & Gaywood, M. J. (2003). The threat of climate change to freshwater pearl mussel populations. *AMBIO: A Journal of the Human Environment*, 32(1), 40-46.

Hulbert, A. J., & Else, P. L. (1989). Evolution of mammalian endothermic metabolism: mitochondrial activity and cell composition. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 256(1), R63-R69.

Iftikar, F. I., MacDonald, J., & Hickey, A. J. (2010). Thermal limits of portunid crab heart mitochondria: Could more thermo-stable mitochondria advantage invasive species? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 395(1), 232-239.

Jutfelt, F., Norin, T., Ern, R., Overgaard, J., Wang, T., McKenzie, D. J., ... & Brijs, J. (2018). Oxygen-and capacity-limited thermal tolerance: blurring ecology and physiology. *Journal of Experimental Biology*, 221(1), jeb169615.

Kake-Guena, S. A., Touisse, K., Warren, B. E., Scott, K. Y., Dufresne, F., Blier, P. U., & Lemieux, H. (2017). Temperature-related differences in mitochondrial function among clones of the cladoceran *Daphnia pulex*. *Journal of Thermal Biology*, 69, 23-31.

Karatayev, A. Y., Burlakova, L. & Padilla, D. K. (1997). The effects of *Dreissena polymorpha* (Pallas) invasion on aquatic communities in eastern Europe. *Journal of Shellfish Research*, 16, 187-203.

Kilbaugh, T. J., Sutton, R. M., Karlsson, M., Hansson, M. J., Naim, M. Y., Morgan, R. W., ... & Margulies, S. S. (2015). Persistently altered brain mitochondrial bioenergetics after

apparently successful resuscitation from cardiac arrest. *Journal of the American Heart Association*, 4(9), e002232.

Koopman, K. R., Collas, F. P., van der Velde, G., & Verberk, W. C. (2016). Oxygen can limit heat tolerance in freshwater gastropods: differences between gill and lung breathers. *Hydrobiologia*, 763(1), 301-312.

Kuznetsov, A. V., Veksler, V., Gellerich, F. N., Saks, V., Margreiter, R., & Kunz, W. S. (2008). Analysis of mitochondrial function in situ in permeabilized muscle fibers, tissues and cells. *Nature Protocols*, 3(6), 965-976.

Lellis, W. A., White, B. S. J., Cole, J. C., Johnson, C. S., Devers, J. L., Gray, E. V. S., & Galbraith, H. S. (2013). Newly documented host fishes for the eastern elliptio mussel *Elliptio complanata*. *Journal of Fish and Wildlife Management*, 4(1), 75-85.

Lemieux, H. Blier, P.U. & Gnaiger, E. (2017) Remodeling pathway control of mitochondrial respiratory capacity by temperature in mouse heart: electron flow through the Q-junction in permeabilized fibers. *Scientific Reports* 7, 2840.

Lockwood, B. L., Sanders, J. G., & Somero, G. N. (2010). Transcriptomic responses to heat stress in invasive and native blue mussels (genus *Mytilus*): molecular correlates of invasive success. *Journal of Experimental Biology*, 213(20), 3548-3558.

Lockwood, B. L., & Somero, G. N. (2011). Invasive and native blue mussels (genus *Mytilus*) on the California coast: the role of physiology in a biological invasion. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 400(1), 167-174.

Lopes-Lima, M., Sousa, R., Geist, J., Aldridge, D.C., Araujo, R., Bergengren, J., Bernal, Y., Bodis, E., Burlakova, L., Van Damme, D., Douda, K., Froufe, E., Georgiev, D., Gumpinger, C., Karatayev, A., Kebapci, U., Killeen, I., Lajtner, J., Larsen, B.M., Lauceri, R., Legakis, A., Lois, S., Lundberg, S., Moorkens, E., Motte, G., Nagel, K.O., Ondina, P., Outeiro, A., Paunovic, M., Prie, V., von Proschwitz, T., Riccardi, N., Rudzite, M., Rudzitis, M., Scheder, C., Seddon, M., Sereflisan, H., Simic, V., Sokolova, S., Stoeckl, K., Taskinen, J., Teixeira, A., Thielen, F., Trichkova, T., Varandas, S., Vicentini, H., Zajac, K., Zajac, T. & Zogaris, S. (2017) Conservation status of freshwater mussels in Europe: state of the art and future challenges. *Biological Reviews Cambridge Philosophical Society*, 92, 572-607.

Lin, T. Y., & Markhart, A. H. (1990). Temperature effects on mitochondrial respiration in *Phaseolus acutifolius* A. Gray and *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiology*, 94(1), 54-58.

Ludyanskiy, M. L., McDonald, D., & MacNeill, D. (1993). Impact of the zebra mussel, a bivalve invader. *BioScience*, 43(8), 533-544.

Lydeard, C., Cowie, R. H., Ponder, W. F., Bogan, A. E., Bouchet, P., Clark, S. A., Cummings, K. S., Frest, T. J., Gargominy, O., Herbert, D. G., Hershler, R., Perez, K. E., Roth, B., Seddon, M., Strong, E. E. & Thompson, F. G. (2004). The global decline of nonmarine mollusks. *BioScience* 54, 321–330.

Martin, J., Horwich, A. L., & Hartl, F. U. (1992). Prevention of protein denaturation under heat stress by the chaperonin Hsp60. *Science*, 258(5084), 995-999.

Martin, K. R. C., "Upper Thermal Limits Of Freshwater Mussels (Bivalvia, Unionoida) In Ramped Temperature Exposures" (2016). MSU Graduate Theses. 2969. McMahon, R. F. (1996). The physiological ecology of the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*, in North America and Europe. *American Zoologist*, 36(3), 339-363.

McDonald, A. E., Pichaud, N., & Darveau, C. A. (2018). "Alternative" fuels contributing to mitochondrial electron transport: Importance of non-classical pathways in the diversity of animal metabolism. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 224, 185-194.

McMahon, R. F. (1996). The physiological ecology of the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*, in North America and Europe. *American Zoologist*, 36(3), 339-363.

McMahon, R. F. (2002). Evolutionary and physiological adaptations of aquatic invasive animals: r selection versus resistance. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 59(7), 1235-1244.

Menzel, A., Sparks, T. H., Estrella, N., Koch, E., Aasa, A., Ahas, R., ... & Chmielewski, F. M. (2006). European phenological response to climate change matches the warming pattern. *Global Change Biology*, 12(10), 1969-1976.

Mills, E. L., Dermott, R. M., Roseman, E. F., Dustin, D., Mellina, E., Conn, D. B., & Spidle, A. P. (1993). Colonization, ecology, and population structure of the "quagga" mussel (Bivalvia: Dreissenidae) in the lower Great Lakes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 50(11), 2305-2314.

Moyes, C. D., Suarez, R. K., Hochachka, P. W., & Ballantyne, J. S. (1990). A comparison of fuel preferences of mitochondria from vertebrates and invertebrates. *Canadian Journal of Zoology*, 68(7), 1337-1349.

Müller, M., Mentel, M., van Hellemond, J. J., Henze, K., Woehle, C., Gould, S. B., Yu, R., van der Giezen, M., Tielens, A. G. M. & Martin, W. F. (2012). Biochemistry and evolution of anaerobic energy metabolism in eukaryotes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76(2), 444-495.

Nguyen, K. D. T., Morley, S. A., Lai, C. H., Clark, M. S., Tan, K. S., Bates, A. E., & Peck, L. S. (2011). Upper temperature limits of tropical marine ectotherms: global warming implications. *PLoS One*, 6(12), e29340.

Oellermann, M., Pörtner, H. O., & Mark, F. C. (2012). Mitochondrial dynamics underlying thermal plasticity of cuttlefish (*Sepia officinalis*) hearts. *Journal of Experimental Biology*, 215(17), 2992-3000.

Pandolfo, T.J., Cope, W.G., Arellano, C., Bringolf, R.B., Barnhart, M.C. & Hammer, E. (2010) Upper thermal tolerances of early life stages of freshwater mussels. *Journal of the North American Benthological Society*, 29, 959-969.

Paquet, A., Picard, I., Caron, F., & Roux, S. (2005). Les moules au Québec. *Le naturaliste canadien*, 129(1), 78-85.

Pepin, P. (1991). Effect of temperature and size on development, mortality, and survival rates of the pelagic early life history stages of marine fish. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 48(3), 503-518.

Pfeiffer, T., Schuster, S., & Bonhoeffer, S. (2001). Cooperation and competition in the evolution of ATP-producing pathways. *Science*, 292(5516), 504-507.

Pichaud, N., Chatelain, E. H., Ballard, J. W. O., Tanguay, R., Morrow, G., & Blier, P. U. (2011). Thermal sensitivity of mitochondrial metabolism in two distinct mitotypes of *Drosophila simulans*: evaluation of mitochondrial plasticity. *Journal of Experimental Biology*, 213(10), 1665-1675.

Pisek, A., Larcher, W., Vegis, A., Nap-Zin, K., Precht, H., Christopherson, J., & Hensel, H. (1973). *Temperature and life*. Springer Publishing

Pörtner, H. O., Hardewig, I., & Peck, L. S. (1999). Mitochondrial function and critical temperature in the Antarctic bivalve, *Laternula elliptica*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 124(2), 179-189.

Pörtner, H. (2001). Climate change and temperature-dependent biogeography: oxygen limitation of thermal tolerance in animals. *Naturwissenschaften*, 88(4), 137-146.

Pörtner, H., & Farrell, A. P. (2008). Physiology and climate change. *Science*, 690-692.

Pörtner, H., Bock, C., & Mark, F. C. (2017). Oxygen-and capacity-limited thermal tolerance: bridging ecology and physiology. *Journal of Experimental Biology*, 220(15), 2685-2696.

Pörtner, H., & Knust, R. (2007). Climate change affects marine fishes through the oxygen limitation of thermal tolerance. *Science*, 315(5808), 95-97.

Rada B, Leto TL (2008). "Oxidative innate immune defenses by Nox/Duox family NADPH oxidases" (PDF). *Contributions to Microbiology*, 15, 164-87.

Ram, J. L., Fong, P. P., & Garton, D. W. (1996). Physiological aspects of zebra mussel reproduction: maturation, spawning, and fertilization. *American Zoologist*, 36(3), 326-338.

Riley, P. A. (1994). Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. *International Journal of Radiation Biology*, 65(1), 27-33.

Robb, E. L., Winkelmolen, L., Visanji, N., Brotchie, J., & Stuart, J. A. (2008). Dietary resveratrol administration increases MnSOD expression and activity in mouse brain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 372(1), 254-259.

Rogelj, J., Meinshausen, M., & Knutti, R. (2012). Global warming under old and new scenarios using IPCC climate sensitivity range estimates. *Nature climate change*, 2(4), 248.

Schulte, P. M. (2015). The effects of temperature on aerobic metabolism: towards a mechanistic understanding of the responses of ectotherms to a changing environment. *Journal of Experimental Biology*, 218(12), 1856-1866.

Stachowicz, J. J., Terwin, J. R., Whitlatch, R. B., & Osman, R. W. (2002). Linking climate change and biological invasions: ocean warming facilitates nonindigenous species invasions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(24), 15497-15500.

Strayer, D.L., Downing, J.A., Haag, W.R., King, T.L., Layzer, J.B., Newton, T.J. & Nichols, S.J. (2004) Changing perspectives on pearly mussels, North America's most imperiled animals. *BioScience*, 54, 429–439.

Takahashi, M., Keicho, K., Takahashi, H., Ogawa, H., Schulte, R. M., & Okano, A. (2000). Effect of oxidative stress on development and DNA damage in in-vitro cultured bovine embryos by comet assay. *Theriogenology*, 54(1), 137-145.

Townsend, K., & Tseng, Y. H. (2012). Brown adipose tissue: recent insights into development, metabolic function and therapeutic potential. *Adipocyte*, 1(1), 13-24.

Valle, A., Oliver, J., & Roca, P. (2010). Role of uncoupling proteins in cancer. *Cancers*, 2(2), 567-591.

Van der Putten, W. H., Macel, M., & Visser, M. E. (2010). Predicting species distribution and abundance responses to climate change: why it is essential to include biotic interactions across trophic levels. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 365(1549), 2025-2034.

Vasseur, D. A., DeLong, J. P., Gilbert, B., Greig, H. S., Harley, C. D., McCann, K. S., Savage, V., Tunney, T. D. & O'Connor, M. I. (2014). Increased temperature variation poses a greater risk to species than climate warming. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281(1779), 20132612.

Vaughn, C. C., Nichols, S. J., & Spooner, D. E. (2008). Community and foodweb ecology of freshwater mussels. *Journal of the North American Benthological Society*, 27(2), 409-423.

Verbrugge, L. N., Schipper, A. M., Huijbregts, M. A., Van der Velde, G., & Leuven, R. S. (2012). Sensitivity of native and non-native mollusc species to changing river water temperature and salinity. *Biological Invasions*, 14(6), 1187-1199.

Wakida-Kusunoki, A. T., Wakida, F. T., Leon-Sandoval, D., & Mario, J. (2015). First record of quagga mussel *Dreissena rostriformis bugensis* (Andrusov, 1897) (Bivalvia, Dreissenidae) from Mexico. *Bioinvasions Record*, 4(1).

Walther, G. R., Post, E., Convey, P., Menzel, A., Parmesan, C., Beebee, T. J., ... & Bairlein, F. (2002). Ecological responses to recent climate change. *Nature*, 416(6879), 389-395.

White, C. R., Alton, L. A., & Frappell, P. B. (2011). Metabolic cold adaptation in fishes occurs at the level of whole animal, mitochondria and enzyme. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 279(1734), 1740-1747.

Williams, J. D, M. L. Warren, K. S. Cummings, J. L. Harris, and R. J. Neves (1993). "Conservation Status of Freshwater Mussels of the United States and Canada". *Fisheries*, 18 (9), 6-22.